



# Etude de quatre lichens marins, maritime ou terrestre et des bactéries associées : Evaluation de la diversité bactérienne et recherche de métabolites d'intérêt

Delphine Parrot

## ► To cite this version:

Delphine Parrot. Etude de quatre lichens marins, maritime ou terrestre et des bactéries associées : Evaluation de la diversité bactérienne et recherche de métabolites d'intérêt. Biochimie, Biologie Moléculaire. INSA de Rennes; Karl-Franzens-Universität (Graz, Autriche), 2014. Français. NNT : 2014ISAR0018 . tel-01363578

**HAL Id: tel-01363578**

**<https://theses.hal.science/tel-01363578>**

Submitted on 10 Sep 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



**THESE INSA Rennes**  
*sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne*  
pour obtenir le titre de

**DOCTEUR DE L'INSA DE RENNES**

*Spécialité : Chimie*

présentée par

**Delphine Anne Emeline PARROT**

**ECOLE DOCTORALE : Sciences de la Matière (sdIm)**

**LABORATOIRE : UMR CNRS 6226 ISCR, Equipe PNSCM (Produits Naturels, Synthèse, Chimie Médicinale)**

**Etude de quatre lichens  
marins, maritime ou  
terrestre et  
des bactéries associées :  
Evaluation de la diversité  
bactérienne et recherche de  
métabolites d'intérêt**

**Thèse soutenue le 09.09.2014**  
devant le jury composé de :

**Pascal RICHOMME**

Professeur - UFR des sciences pharmaceutiques, SFR 4207 QUASAV, Angers / *Président*

**Didier STIEN**

Directeur de Recherche - ICSN, Gif/Yvette / *Rapporteur*

**Philippe POTIN**

Directeur de Recherche - UPMC, Station Biologique Roscoff / *Rapporteur*

**Isabelle CARLETTI**

Chercheur - Chimie Pierre Fabre Médicaments, Toulouse / *Examineur*

**Marcelino T. SUZUKI**

Professeur - UPMC, LBBM, Observatoire Océanologique de Banyuls/Mer / *Examineur*

**Martin GRUBE**

Professeur - Université de Graz, Autriche / *Co-directeur de thèse*

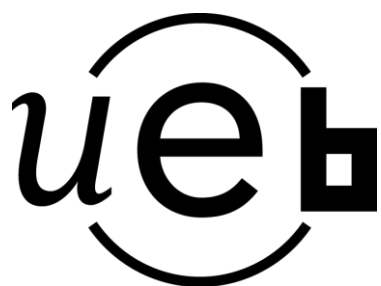
**Sophie TOMASI**

Professeur - Université de Rennes 1 / *Directeur de thèse*



# **Etude de quatre lichens marins, maritime et terrestre et des bactéries associées : Evaluation de la diversité et recherche de métabolites d'intérêt**

Delphine Anne Emeline PARROT



En partenariat avec



Document protégé par les droits d'auteur





# Remerciements

---

Cette thèse a été entièrement financée par un financement ministériel INSA et à ce titre je souhaite remercier le Pr. Jean Yves Saillard pour le soutien pour l'obtention de ce financement et le Pr. Sophie Tomasi pour m'avoir contacté et choisi de continuer à travailler avec moi, comme doctorante sur ce sujet de thèse.

Tout d'abord, je voudrais remercier les rapporteurs de mon travail : Dr. Didier Stien (Directeur de recherche CNRS, Gif/Yvette), Dr. Philippe Potin (Directeur de recherche CNRS, Roscoff, Paris VI) ainsi que les autres membres du jury : Pr. Pascal Richomme (Professeur, UFR Sciences Pharmaceutiques, Angers), Pr. Marcelino Suzuki (Professeur, Banyuls/Mer, Paris VI), Dr. Isabelle Carletti (Chercheur Chimie, Pierre Fabre Médicaments, Toulouse), Pr. Martin Grube (Professeur, Université de Graz, Autriche) et Pr. Sophie Tomasi (Professeur, Université de Rennes 1) qui me font l'honneur et le plaisir de juger mon travail de thèse.

Merci au Pr. Joël Boustie, Pr. Helmut Mayrhofer et au Pr. Philippe Lebaron pour m'avoir permis de réaliser mes travaux de thèse au sein de leur Institut respectif (UMR CNRS 6226, ISCR, Equipe PNSCM, Rennes ; Institut de Biologie Végétale de Graz, Autriche ; Observatoire Océanologique de Banyuls/Mer).

Je tiens à remercier tout particulièrement Sophie Tomasi et Martin Grube, ma directrice et mon co-directeur de thèse pour m'avoir confié ce sujet de thèse pluridisciplinaire, m'avoir fait confiance et également pour m'avoir permis de le réaliser librement. Merci vraiment beaucoup Sophie pour tous tes conseils, nos échanges, ta disponibilité (autant que possible pour toi), ton réconfort lors de mes quelques moments de paniques (professionnels et personnels) au cours de ces 3 superbes années de thèse ! Merci également pour la confiance que tu m'as accordée (au laboratoire comme lors de mes séjours à Banyuls/Mer et en Autriche), tes encouragements et le soutien que tu m'as apportés et témoignés. Je tiens aussi à te remercier pour m'avoir donné plusieurs fois l'opportunité de participer à des congrès (nationaux comme internationaux). J'ai appris beaucoup à tes côtés notamment à avoir encore d'avantage confiance en moi, à me donner la possibilité de m'intégrer dans diverses équipes de recherche et aussi à me « jeter à l'eau » lors de congrès pour aller discuter avec le Pr. Pieter Dorrestein en particulier !!! Merci aussi à toi Martin pour m'avoir accueillie deux fois au sein de ton laboratoire (environ 4 mois au total grâce à une bourse Rennes métropole et l'obtention d'un PhC amadeus), et pour tes conseils, remarques et suggestions avisés. Merci aussi de m'avoir fait confiance, de m'avoir initiée à ta microbiologie (FISH/CLSM, phylogénie etc...), permis de faire de la chimie en me proposant les moyens et les collaborateurs au sein de l'Institut de Biologie Végétale de Graz et également d'enrichir mes connaissances et compétences en lichénologie avec toi comme par les cours

que j'ai pu suivre durant mon séjour. Mes séjours en Autriche (seule ou en compagnie de Sophie) ont toujours été très bénéfiques aussi bien sur le plan scientifique que sur le plan personnel (notamment pour l'amélioration de mon anglais puisque je ne parlais pas un mot d'allemand ! et aussi à être autonome dans un autre pays que le mien). Tu as su attiser ma curiosité. Un grand merci à vous deux pour les bons moments qu'on a pu partager en marge de l'aspect scientifique, comme lors de congrès, récoltes, soirées Rennaises et Autrichiennes ... !!

En dehors de ma directrice et de mon co-directeur de thèse, je tiens également à remercier le Pr. Marcelino Suzuki pour m'avoir aussi accueillie deux fois au sein de son équipe (sans même me connaître) qui sans cela, la réalisation de mon sujet de thèse n'aurait pas été aussi complète. Merci de m'avoir permis de découvrir les techniques de base en microbiologie (isolement, séquençage, screening génétique ...), de m'avoir fait confiance, de tes conseils importants (pour une non-spécialiste comme moi) lors de nos discussions et aussi pour la bonne humeur générale de ton équipe.

Je tiens aussi à remercier toutes les personnes de toutes ces différentes équipes avec qui j'ai eu l'occasion et le plaisir de travailler, leurs aides, conseils et leur agréable compagnie :

A *Rennes*, Aurélie (pour ton aide), Isabelle (pour mes tests cytotoxiques), David (pour les récoltes et permis de découvrir l'enseignement à tes côtés), Marylène (pour tes précieux conseils), Pierre et Mickael (pour la RMN et l'aide dans l'identification structurale de certains de mes composés), Nicolas (pour m'avoir fait découvrir la synthèse) et Olivier (pour toutes les informations que tu m'as donné concernant les formations qui m'intéressaient). Je tiens également à remercier les étudiantes et les postdocs avec qui j'ai eu l'occasion de travailler durant ces trois années. Ces rencontres qui m'ont permis d'apprendre à déléguer, à faire confiance et surtout permis d'avancer sur mon sujet : merci beaucoup à toi Tiphaine pour ton aide et aussi d'être revenue bénévolement travailler avec moi durant 4-5 mois et ton amitié, Gwennaëlle, Emeline, Satya et surtout Nathalie pour votre apport et votre aide. Et sans oublier de remercier les autres membres de l'équipe (permanents et de passages): Françoise, Béatrice, Tram, Huyen, Pierre (pour les analyses de masse de type DART), Friardi, Nina, Claudia, Michèle, Jeff, Gilles, Philippe, Jean-Pierre, Patricia, Vianney, Maïween, Marie, Morgane, Dinh, Ha, Huong et tous les autres qui m'échappent !

Je tiens à remercier particulièrement Maryse (notre secrétaire) pour avoir géré sans faille tous mes déplacements ainsi que l'envoi de colis en Autriche et/ou à Banyuls/Mer. Grand merci à toi Maryse !

A *Banyuls/Mer*, merci à vous : Laurent, Clémence, Cécile, Elodie, Sanjay, Sapna (pour vos conseils et aide dans l'isolement, le séquençage, le screening de mes nombreuses souches bactériennes et pour votre disponibilité et votre gentillesse). Je tiens aussi à remercier Nyree (pour l'étude des communautés bactériennes associées aux lichens par pyroséquençage), Nicole, Audrey, Alice, Alicia,

Marine et tous les autres que j'ai pu côtoyer durant mes deux séjours parmi vous. C'était un grand plaisir de travailler avec vous.

A *Graz*, merci beaucoup à Barbara (pour ton aide, ton amitié et de m'avoir permis de passer de bons moments et aussi un super Noël au sein de ta famille), Dorli, Sigrum, Lucie, Massimiliano, Philipp, Ines, Stefi, Anthonia, Toby et tous les autres pour votre aide, votre patience (pour mon anglais moyen mais qui a progressé grâce à vous) et/ou simplement pour votre bonne humeur et gentillesse. Merci aussi au Pr. Hartwig Pfeifhofer et Klaus Remele pour m'avoir permis de réaliser au sein de votre laboratoire mes analyses HPLC.

Outre déjà toutes ces personnes, je tiens également à remercier l'ensemble du laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Rennes 1, et en particulier Sandrine et Latifa qui m'ont apporté leurs conseils, aide et surtout permis d'avoir accès à leur laboratoire pour certaines de mes expériences, le CRMPO (Centre de mesure physique de l'Ouest) pour les analyses de masses hautes résolutions et en particulier Philippe pour toutes nos discussions et ton aide pour l'identification de mes produits, le PRISM pour m'avoir permis de réaliser mes analyses RMN (Sandrine et Arnaud), de m'avoir donné la possibilité lorsque cela était possible d'utiliser également leur incubateur (Céline et Angélique) et de m'avoir aidé à analyser mes données d'un point de vue statistique et valider mes plans d'expériences (Eric). Je tiens aussi à remercier, Daniel (Campus de Beaulieu, Rennes) pour m'avoir aidé et donné accès à des broyeurs planétaires à boules pour l'étude de mes lichens.

Et enfin, en terme de laboratoire, je tiens à remercier le laboratoire BIA (INRA de Rennes, plateforme P2M2) et en particulier Sylvain, Hélène, Nathalie, Angélique et tous les autres pour m'avoir permis de réaliser mes analyses LC/MS, pour vos conseils, votre aide et de m'avoir fait confiance pour l'utilisation de l'instrument. C'est toujours pour moi un plaisir de revenir vous voir après mes premiers pas dans la recherche avec vous. Merci Sylvain et Nathalie pour cette première expérience dans la recherche.

Merci aussi au Pr. Pieter Dorrestein (SCRIPS, La Jolla, USA) pour m'avoir donné accès à leur plateforme pour la réalisation de mes « Molecular Network » via Enora.

Une dédicace aussi pour remercier tous mes ami(e)s, Cécile, Denis, Pascal, Kévin, Clément, Manon, Nolwenn, Tiphaine pour tous les bons moments en terrasses ou pas ! Merci aussi à toi Vincent, pour les weekends dans le Sud-Est, les randonnées au grand air et les verres en terrasse ça et là. Pleins de bons moments au soleil ! Merci à vous tous et à ma guitare toujours là pour me changer les idées !!

Enfin, je remercie ma famille et surtout mes parents, ma sœur et mon frère pour leur soutien depuis le départ même s'ils auraient voulu me voir plus souvent durant ces trois années ... trop souvent en vadrouille !! Je vous aime.

Merci à vous tous pour cette superbe expérience qui ne fait que commencer !



# Production scientifique

---

## Publications:

**Delphine Parrot**, Saleem Jan, Nicolas Baert, Sylvain Guyot, Sophie Tomasi  
Comparative metabolite profiling and chemical study of *Ramalina siliquosa* complex using LC-ESI-MS/MS approach, *Phytochemistry* **2013**, 89, 114-124.

**Delphine PARROT**, Tiphaine PERESSE, Eric HITTI, Daniel CARRIE, Martin GRUBE, Sophie TOMASI  
Qualitative and spatial metabolite profiling of lichens by LC-MS approach combined with optimized extraction, *Phytochemical Analysis* **2014**, 26, 23-33, doi: [10.1002/pca.2532](https://doi.org/10.1002/pca.2532)

**Delphine PARROT**, Sanjay ANTONY-BABU, Laurent INTERTAGLIA, Martin GRUBE, Muriel BOURAIN, Sophie TOMASI, Marcelino T. SUZUKI  
Littoral lichens as a source of potentially bioactive Actinobacteria, FEMS microbiology and Ecology (*submitted*)

**Delphine PARROT**, Laurent INTERTAGLIA, Marcelino T. SUZUKI, Sophie TOMASI  
Isolation, structural identification of metabolites produced by *Streptomyces cyaneofuscatus*: Bacteria associated with *Lichina confinis*. Structural revision of the N-Me-Dactinomycin, *Journal of Natural Products* (*in prep.*)

**Delphine PARROT**, Laurent INTERTAGLIA, Marcelino T. SUZUKI, Sophie TOMASI  
Isolation, structural identification of metabolites produced by *Hoeflea phototrophica*: a Bacteria associated with *Lichina pygmaea*, *Journal of Natural Products* (*in prep.*)

## Chapitres d'ouvrage:

David DELMAIL, Martin GRUBE, **Delphine PARROT**, Jeanne COOK-MOREAU, Joël BOUSTIE, Pascal LABROUSSE P., Sophie TOMASI  
Halotolerance in lichens: symbiotic coalition against salt stress. In: Ecophysiology and responses of plants under salt stress." P. Ahmad, M.M. Azooz & M.N.V. Prasad (eds.). Springer. **2013**, 115-148.

## Communications orales:

**PARROT Delphine**, INTERTAGLIA Laurent, ROHEE Clémence, DAVID-LE GALL Sandrine, GRUBE Martin, SUZUKI Marcelino T, TOMASI Sophie  
Etude des communautés bactériennes associées à divers lichens dans une approche d'écologie chimique  
1<sup>ère</sup> Rencontre Nationale des Jeunes Chercheurs en Ecologie Chimique, Montpellier, France, 5-7 June **2013**

**PARROT Delphine**, DELMAIL David, INTERTAGLIA Laurent, ROHEE Clémence, DAVID-LEGALL Sandrine, GRUBE Martin, SUZUKI Marcelino T, TOMASI Sophie  
Study of secondary metabolites from lichen-associated *Arthrobacter* sp.  
Journées Streptomyces, Nancy, France, 27-28 September **2012**



**PARROT Delphine**, TOMASI Sophie

Etudes chimiotaxonomiques des lichens des côtes bretonnes : *Ramalina* sp.  
BioChiMar, Paris, France, 27-28 June **2011**

**Posters:**

**PARROT Delphine**, INTERTAGLIA Laurent, ROHEE Clémence, GRUBE Martin, SUZUKI Marcelino T, TOMASI Sophie

Searching natural bioactive products from lichen-associated bacteria  
Gordon Research Conferences (GRC), Ventura, California, 2-7 March **2014**

**PARROT Delphine**, INTERTAGLIA Laurent, GRUBE Martin, SUZUKI Marcelino T, TOMASI Sophie

Lichens: A bacterial hot-spot for the production of bioactive compounds  
Gordon Research Seminar (GRS), Ventura, California, 1-2 March **2014**

**PARROT Delphine**, INTERTAGLIA Laurent, ROHEE Clémence, DAVID-LE GALL Sandrine, GRUBE Martin, SUZUKI Marcelino T, TOMASI Sophie

Searching natural bioactive products from lichen-associated bacteria  
XIV International symposium on Marine Natural Products and 8th European conference on Marine Natural Products (MaNaPro). La Toja - Spain, 15-20 September **2013**

**PARROT Delphine**, HITTI Eric, GRUBE Martin, CARRIE Daniel, TOMASI Sophie

Extraction optimization and metabolite profiling of nine lichens by LC-ESI-MS/MS  
AFERP & STOLON International Symposium, Brussels, 22-24 May **2013**

**PARROT Delphine**, DELMAIL David, DAVID LE-GALL Sandrine, GRUBE Martin, TOMASI Sophie

Study of metabolites from lichen-associated bacterial communities  
International Congress on Natural Products, New York, 28 July to 1 August **2012**.  
In *Planta Medica* vol.78; 1027-1310 (**2012**).

MARNET Nathalie, **PARROT Delphine**, BERNILLON Stephane, BARON Alain, GUYOT Sylvain

LC-MS quantification of caffeicin-like phenolic compounds in apple juices and ciders.  
"Euro-Mediterranean Symposium for Fruit & Vegetable Processing", Avignon, France, 18-21 April **2011**

# Sommaire

<b>Remerciements</b>	<b>V</b>
<b>Production scientifique</b>	<b>IX</b>
<b>Abréviations</b>	<b>XVII</b>
<b>Glossaire</b>	<b>XIX</b>
<b>Liste des figures</b>	<b>XXI</b>
<b>Liste des tableaux</b>	<b>XXV</b>
<b>Liste des annexes</b>	<b>XXVII</b>
<b>Introduction</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCTION.</b>	<b>3</b>
<b>Références bibliographiques (Introduction)</b>	<b>7</b>
<b>Chapitre 1 - Les lichens : Des micro-écosystèmes à eux seuls.</b>	<b>11</b>
<b>PARTIE 1 - Généralités sur les lichens</b>	<b>13</b>
<b>1. Les lichens</b>	<b>15</b>
<b>1.1. Définitions</b>	<b>15</b>
<b>1.2. Diversité et écologie des lichens</b>	<b>16</b>
<b>1.3. Morphologies et anatomie des lichens : thalles, organes &amp; structures</b>	<b>17</b>
1.3.1. Différents types de thalles lichéniques	17
1.3.2. Structures anatomiques	18
<b>1.4. Morphogénèse &amp; Interactions symbiotiques</b>	<b>19</b>
1.4.1. Organes	19
1.4.1.1. Organes non reproducteurs	19
1.4.1.2. Organes reproducteurs	19
1.4.2. Reproduction & cycle de développement	20
1.4.2.1. Reproduction végétative : dissémination du thalle lichénique	20
1.4.2.2. Reproduction sexuée : production de spores par le mycobionte	21
1.4.3. Interactions symbiotiques : mycobiontes et photobiontes	21
<b>1.5. Composition chimique des lichens : métabolites primaires et spécialisés</b>	<b>24</b>
1.5.1. Voies de biosynthèse & principales classes de métabolites	24
1.5.2. Activités biologiques des composés lichéniques	25
<b>2. Espèces lichéniques étudiées</b>	<b>26</b>
<b>2.1. Caractéristiques des espèces lichéniques étudiées</b>	<b>27</b>
2.1.1. Caractères morpho-anatomiques	27
2.1.1.1. Genre <i>Roccella</i>	27
2.1.1.2. Genre <i>Collema</i>	29
2.1.1.3. Genre <i>Leptogium</i>	30
2.1.1.4. Genre <i>Lichina</i>	31
2.1.1.5. Genre <i>Synallissa</i>	32
2.1.2. Composition chimiques et propriétés biologiques	32
2.1.2.1. <i>Roccella fuciformis</i> & <i>Roccella phycospis</i>	33

2.1.2.2.	<i>Lichina confinis</i> & <i>L. pygmaea</i>	35
2.1.2.3.	<i>Collema auriforme</i> , <i>Collema cristatum</i> & <i>Collema fuscovirens</i>	35
2.1.2.4.	<i>Leptogium lichenoides</i> & <i>Synalissa symphorea</i>	36
<b>3.</b>	<b>Conclusion</b>	<b>36</b>
<b>PARTIE 2 - Etudes lichéniques : Profilages chimiques, identifications structurales et localisation in situ de métabolites</b>		<b>39</b>
<b>1.</b>	<b>Objectifs des études lichéniques</b>	<b>41</b>
<b>2.</b>	<b>Résultats</b>	<b>42</b>
2.1.	Optimisation des conditions d'extraction	42
2.1.1.	Mise en place du plan d'expérience	42
2.1.2.	Résultats du plan d'expérience	44
2.1.2.1.	Validation des droites d'étalonnage par CLHP : calibration et limites de détection	44
2.1.2.2.	Optimisation des conditions d'extraction totale	44
2.2.	Profilage chimique des 9 espèces lichéniques	47
2.2.1.	Profilage chimique par LC-ESI-MS/MS de deux espèces lichéniques maritimes du genre <i>Roccella</i> : <i>R. fuciformis</i> & <i>R. phycopsis</i>	47
2.2.1.1.	Fragmentation et hypothèses d'identification	49
2.2.2.	Profilage chimique par LC-ESI-MS/MS de 7 cyanolichens	54
2.2.3.	« Molecular Network » des profilages chimiques par LC/MS	59
2.3.	Profilage chimique de <i>Lichina confinis</i> par Direct Analysis in Real Time (DART)	62
2.4.	Etude chimique de deux espèces du genre <i>Roccella</i> sp.	64
2.5.1.	Etude chimique de <i>R. fuciformis</i> : extractions, isoléments et identifications structurales	64
2.5.2.	Etude chimique de <i>R. phycopsis</i> : extractions, isoléments et identifications structurales	71
2.5.	Localisation des composés lichéniques au sein du lichen	75
2.5.1.	Cas du lichen <i>R. fuciformis</i>	75
2.5.2.	Cas du lichen <i>R. phycopsis</i>	77
2.5.3.	Bilan de l'étude chimique de <i>R. fuciformis</i> & <i>R. phycopsis</i>	79
2.6.	Activités biologiques de composés isolés de <i>Roccella fuciformis</i> & <i>R. phycopsis</i>	82
2.6.1.	Tests antioxydants	82
2.6.1.1.	Résultats du test DPPH	82
2.6.1.2.	Résultats du test de l'anion superoxyde	83
2.6.3.	Tests de mesure de l'activité antiproliférative	84
2.6.4.	Tests antibactériens	85
<b>3.</b>	<b>Conclusion et perspectives de l'étude chimique</b>	<b>86</b>
<b>Références bibliographiques (Chapitre 1)</b>		<b>87</b>
<b>Chapitre 2 - Les lichens : une nouvelle niche bactérienne ?</b>		<b>91</b>
<b>PARTIE 1 - Etat de l'art sur les bactéries associées aux lichens</b>		<b>93</b>
<b>1.</b>	<b>Généralités sur les micro-organismes procaryotes : Bacteria et Archaea</b>	<b>95</b>
<b>2.</b>	<b>Le bactériobionte ou communautés bactériennes associées aux lichens</b>	<b>97</b>

<b>2.1.</b>	<b>Abondance, diversité et localisation</b>	<b>97</b>
2.1.1.	Abondance et localisation par FISH/CLSM	97
2.1.2.	Abondance et diversité bactérienne associée : études dépendantes et indépendantes de la culture	99
<b>2.2.</b>	<b>Facteurs environnementaux et rôles dans la symbiose lichénique</b>	<b>102</b>
2.2.1.	Facteurs environnementaux	102
2.2.2.	Rôles et implications dans la symbiose lichénique	103
<b>2.3.</b>	<b>Métabolites produits par des bactéries associées aux lichens et activités biologiques</b>	<b>105</b>
<b>3.</b>	<b>Conclusion</b>	<b>106</b>
<b><i>PARTIE 2 : Communautés bactériennes associées à quatre lichens: diversité bactérienne et études chimiques.</i></b>		<b>109</b>
<b>1.</b>	<b>Objectifs de l'étude bactériochimique</b>	<b>111</b>
<b>2.</b>	<b>Résultats</b>	<b>112</b>
2.1.	Espèces lichéniques : Récolte	112
2.2.	Espèces lichéniques : Isolement	113
2.3.	Diversité des communautés bactériennes associées	113
2.3.1.	Approche dépendante de la culture : diversité des communautés bactériennes associées cultivables	113
2.4.	Criblages génétiques et biologiques	119
2.5.	Etudes bactériochimiques	121
2.5.1.	Etude chimique de MOLA1488 : <i>Streptomyces cyaneofuscatus</i>	122
2.5.1.1.	Généralités des <i>Streptomycetaceae</i> : <i>Streptomyces</i> sp.	122
2.5.1.2.	<i>Streptomyces cyaneofuscatus</i> (MOLA1488) : Etude chimique	124
2.5.1.2.1.	Propriétés biologiques	124
2.5.1.2.2.	Analyses LC-ESI-MS/MS	126
2.5.1.2.3.	Isolement et identification des métabolites	127
2.5.1.2.4.	Evaluation des propriétés biologiques	139
2.5.2.	Etude chimique de MOLA1416 : <i>Hoeflea phototrophica</i>	139
2.5.2.1.	<i>Phyllobacteriaceae</i> : <i>Hoeflea</i> sp.	139
2.5.2.1.1.	Propriétés biologiques	140
2.5.2.1.2.	Analyses LC-ESI-MS/MS	141
2.5.2.1.3.	Isolement et identification des métabolites	143
2.5.2.1.4.	Evaluation des propriétés biologiques	149
2.6.	Etudes comparatives par « Molecular Network »	150
2.6.1.	Profilages chimiques et propriétés biologiques	150
2.6.1.1.	Propriétés biologiques	150
2.6.1.2.	Profilages chimiques et dérégulation	152
<b>3.</b>	<b>Conclusion et perspectives de l'étude bactériochimique</b>	<b>158</b>
<b><i>PARTIE 3 - Extraits lichéniques/bactéries associées.</i></b>		<b>161</b>
<b>1.</b>	<b>Objectifs de l'étude de l'influence d'extraits lichéniques sur le métabolisme des bactéries associées</b>	<b>163</b>
<b>2.</b>	<b>Résultats</b>	<b>164</b>

2.1.1.	Impact des métabolites lichéniques sur la croissance et le métabolisme bactérien	164
2.1.1.1.	Optimisation d'une méthode d'évaluation de la viabilité bactérienne par le bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT)	164
2.1.1.2.	Impact sur la croissance bactérienne : Résultats	166
2.1.1.3.	Impact sur le métabolisme bactérien : Résultats	167
2.1.2.	Potentialité de bioconversion des bactéries associées	171
2.1.2.1.	Cas de l'acide léprarique (Autriche, PHC Amadeus)	172
2.1.2.2.	Cas du (+)-érythrine (Rennes)	173
<b>3.</b>	<b>Conclusion et perspectives</b>	<b>175</b>
	<b>Références bibliographiques (Chapitre 2)</b>	<b>176</b>
	<b>Conclusion et Perspectives</b>	<b>179</b>
	<b>CONCLUSION &amp; PERSPECTIVES.</b>	<b>181</b>
	<b>Matériels &amp; Méthodes</b>	<b>185</b>
	<b>Matériels &amp; Méthodes.</b>	<b>187</b>
<b>1.</b>	<b>Procédure générale</b>	<b>187</b>
1.1.	Solvants et réactifs	187
1.2.	Méthodes séparatives	187
1.2.1.	Chromatographie sur couche mince (CCM) préparative	187
1.2.2.	Chromatographie sur colonne sous pression : Chromatographie de type flash	187
1.3.	Méthodes analytiques	187
1.3.1.	Chromatographie sur couche mince (CCM) analytiques	187
1.3.2.	Chromatographie sur couche mince haute performance (HPTLC)	188
1.3.4.	Chromatographie liquide haute performance (CLHP) couplée à un détecteur à barrettes de diodes et de masse (LC-ESI-MS/MS)	189
1.3.5.	Spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire	190
1.3.6.	Spectre de masse haute résolution (HRMS)	190
1.3.7.	Pouvoir Rotatoire	191
1.3.8.	Tests biologiques	191
1.3.8.1.	Activités antibactériennes	191
1.3.8.2.	Propriétés cytotoxiques	192
<b>2.</b>	<b>Matériels &amp; Méthodes de la Partie 2</b>	<b>193</b>
2.1.	Identification des lichens : réactions thallines	193
2.2.	Systèmes de broyage	193
2.2.1.	Broyage au mixeur	193
2.2.2.	Broyage au mortier	193
2.2.3.	Broyeurs planétaires à boules (Campus Beaulieu, Rennes)	193
2.3.	Extraction des lichens	194
2.3.1.	Extractions en parallèles	194
2.3.2.	Extractions sous reflux	194
2.4.	Analyses des extraits	194
2.4.1.	Techniques analytiques	194
2.4.1.1.	Chromatographies sur couche mince (CCM)	194
2.4.1.2.	LC-ESI-MS/MS	195
2.4.1.3.	DART-MS (direct analyses real time)	195
2.4.2.	Techniques séparatives	196
2.4.2.1.	Chromatographie sur couche mince préparative	196

2.4.2.2.	Chromatographie de type flash	196
2.4.3.	Techniques de purification	197
2.4.3.1.	Recristallisation	197
<b>2.5.</b>	<b>Activités biologiques</b>	<b>197</b>
2.5.1.	Test antioxydant : DPPH	197
2.5.1.1.	Principe	197
2.5.1.2.	Mode opératoire	198
2.5.2.	Test de l'anion superoxyde	198
2.5.2.1.	Principe	198
2.5.2.2.	Mode opératoire	199
<b>2.6.</b>	<b>Descriptif des métabolites isolés de <i>Rocella fuciformis</i> &amp; <i>Rocella phycopsis</i></b>	<b>199</b>
2.6.1.	(+)-Acétylportentol (RF1)	200
2.6.2.	Acide léprarique (RF2)	201
2.6.3.	(+)-érythrine (RF3 et RP3)	202
2.6.4.	Meso-érythritol (RF4 et RP4)	203
2.6.5.	Montagnéol (RF6)	204
2.6.6.	Orsellinate de méthyle (RF7)	205
2.6.7.	(+)- Acide roccelique (RP1)	206
2.6.8.	Acide lécanorique (RP2)	207
<b>3.</b>	<b>Matériels &amp; Méthodes de la Partie 4</b>	<b>208</b>
<b>3.1.</b>	<b>Isolement des communautés bactériennes</b>	<b>208</b>
3.1.1.	Approche dépendante de la culture	208
3.1.1.1.	Protocole utilisé pour <i>Rocella</i> sp. & <i>Lichina</i> sp. (Laboratoire LBBM, Banyuls/Mer, France, Pr M. Suzuki)	208
3.1.1.2.	Protocole utilisé pour <i>Collema</i> sp. (Institut für Pflanzenwissenschaften, Karl-Franzens Universität, Graz, Autriche, Pr. M. Grube)	209
3.1.1.3.	Extraction - Purification du gène de ARNr 16S	210
3.1.1.4.	Cryoconservation	212
3.1.1.5.	Séquençage et analyse des séquences	212
<b>3.2.</b>	<b>Propriétés biologiques des colonies bactériennes</b>	<b>213</b>
3.2.1.	Propriétés antibactériennes : technique de la gélose molle	213
<b>3.3.</b>	<b>Analyses chimiques des colonies bactériennes</b>	<b>213</b>
3.3.1.	Milieux de culture et protocole d'extraction	213
3.3.2.	Etude chimique de deux souches bactériennes cultivables associées aux lichens	214
3.3.3.	Techniques analytiques	215
3.3.3.1.	CLHP et LC-ESI-MS/MS	215
3.3.4.	Techniques séparatives	215
3.3.4.1.	Chromatographie sur couche mince préparative	215
3.3.4.2.	Chromatographie liquide semi-préparative	216
3.3.4.3.	Chromatographie de type flash	216
<b>3.4.</b>	<b>Descriptif des produits isolés</b>	<b>216</b>
3.4.1.	3-(hydroxyacétyl) indole (D2)	217
3.4.2.	Cyclo-(-L-Phe, L-Pro) (D7)	218
3.4.3.	Cyclo-(-L-Leu, L-Pro) (D8)	219
3.4.4.	N-Méthyl-Dactinomycine (D9)	220
3.4.5.	N-acétyl- $\beta$ -oxotryptamine (D10)	221
3.4.6.	Composé D12	222
3.4.7.	6-méthoxy, 2-méthyl, 3-heptylprodiginine (R1)	223
3.4.8.	Benzenepropanoate de, 4-(1,1-diméthyléthyl)- $\beta$ [4-(1,1-diméthyléthyl)-3-(hydroxyphényle)]-3-hydroxy- $\beta$ -méthyl-1,2-éthanediyle	224



<b>4. Matériels &amp; Méthodes de la Partie 5</b>	<b>225</b>
<b>4.1. Mesure de viabilité de cultures bactériennes par le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tetrazolium (MTT)</b>	<b>225</b>
<b>4.2. Profilages chimiques</b>	<b>225</b>
4.2.1. Chromatographie liquide couplée à un détecteur à barrette de diode (DAD)	225
4.2.2. Chromatographie liquide couplée à un détecteur de masse (LC-ESI-MS/MS)	225
<b>Références Bibliographiques</b>	<b>227</b>
<b>Références bibliographiques</b>	<b>229</b>
<b>Annexes</b>	<b>239</b>
<b>Annexes</b>	<b>241</b>

# Abréviations

---

**AcOEt** : Acétate d'éthyle  
**ANOVA** : Analyse de variance  
**ANS** : Anisaldéhyde sulfurique  
**C** : Hypochlorite de sodium  
**CCM** : Chromatographie sur couche mince  
**CD<sub>3</sub>OD** : Méthanol deutéré  
**CDCl<sub>3</sub>** : Chloroforme deutéré  
**CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>** : Dichlorométhane  
**CH<sub>3</sub>COOH** : Acide acétique  
**CHCl<sub>3</sub>** : Chloroforme  
**CI<sub>50</sub>** : Concentration inhibitrice à 50%  
**COSY** : Correlated Spectroscopy  
**DART** : Direct analysis in real time (analyse direct en temps réel)  
**DCM** : Dichlorométhane  
**DGGE** : Electrophorèse sur gel en gradient dénaturant  
**DMSO** : Diméthylsulfoxyde  
**DPPH** : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle  
**EE** : Diéther éthylique  
**EP** : Ether de pétrole  
**HCOOH** : Acide formique  
**HMBC** : Heteronuclear Multiple Bond Correlation  
**HSQC** : Heteronuclear Single Quantum Coherence  
**HPLC ou CLHP** : Chromatographie liquide haute pression  
**HRESIMS** : Spectrométrie de Masse haute résolution en mode d'ionisation électrospray  
**ITS** : Internal transcribed Spacer (régions non codantes du gène de l'ARNr 16S)  
**jmod** : J-modulated spin-echo  
**K** : Potasse  
**LC-ESI-MS/MS** : Chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse  
**MeOH** : Méthanol  
**MM** : Masse moléculaire  
**MS** : Mass spectrometry  
**OTU** : Operational taxonomic unit  
**P** : *para-phénylethylèneamine*  
**PDA** : Photodiode array  
**PEG** : Polyéthylène glycol  
**PKS** : Polyketide synthases  
**PM** : Poids moléculaire  
**ppm** : Partie par millions  
**Rdt** : Rendement  
**R.I** : Intensité relative  
**RMN** : Résonance magnétique nucléaire  
**RSD** : Déviation standard d'erreur  
**SD** : Standard déviation  
**SSCP** : Single strand conformation polymorphism  
**THF** : Tétrahydrofurane  
**TOCSY** : Total Correlation Spectroscopy  
**t<sub>R</sub>** : Temps de rétention

**uma** : Unité de masse atomique  
**UV** : Ultraviolet

# Glossaire

---

**Apothécies** : Fructifications de lichen avec un disque ouvert correspondant à un hyménium non clos.

**Appressarium** : Système utilisé par les champignons pour pénétrer dans une cellule hôte

**Céphalodies** : Formations organisées par le mycobionte du lichen, mais contenant un photobionte différent de celui qui domine le thalle proprement dit. Les céphalodies sont connues uniquement chez les lichens à algues vertes et contiennent toujours une cyanobactérie.

**Cils** : Organes particuliers des lichens ne servant pas à l'adhésion du thalle au substrat. Ils peuvent être localisés à la marge du thalle ou des ascocarpes.

**Cyphelles** : Dépressions de contour généralement arrondi, assez profondes et à cavité de couleur claire, que l'on observe à la face inférieure des thalles du genre *Sticta*.

**Digité** : En forme de doigt.

**Fibrilles** : Petits filaments de même couleur que le thalle.

**Haptères** : Crampons de fixation.

**Haustorium** : Organe d'une plante ou d'un champignon parasite, qui s'insère dans les tissus de la plante hôte, pour absorber l'eau et les nutriments

**Hétéromère** : Constitué d'éléments non mêlés mais disposés en couches spécifiques.

**Homéomère** : Constitué d'éléments mêlés de façon homogène.

**Hyménium** : Partie de l'apothécie composée d'asques et de paraphyses.

**Isidies** : Petites excroissances du thalle, toujours cortiquées.

**Lecanorine (apothécie)**<sup>1</sup> : Apothécies présentant des cellules algales.

**Lécidéine (apothécie)**<sup>1</sup> : Apothécies dépourvues de cellules algales.

**Nodules** : Saillies du thalle, en cônes, visibles à l'œil nu.

**Papilles** : Minuscules excroissances coniques, visibles à la loupe.

**Paraphyses** : Filaments simples ou ramifiés constituant l'hyménium.

**Plectenchyme** : Faux tissu, parfois très structuré, formé de l'association d'hyphes mycéliens.

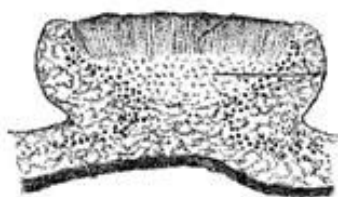
**Phyllidies** : Tissu de régénération d'une partie lésée d'un thalle lichénique, auquel les deux symbiontes participent.

**Poils** : Ensemble d'hyphes plus ou moins libres et fines, parfois incurvées pouvant se développer à la surface du thalle. Leur ensemble forme un tomentum.

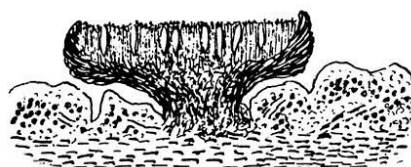
**Pseudocyphelles** : Ce sont des interruptions du cortex laissant entrevoir la médulle sous-jacente. Elles peuvent être ténues ou bien distinctes, et peuvent adopter des formes diverses : punctiformes, allongées ou linéaires ou en réseau.

---

<sup>1</sup>



Apothécie de type Lecanorine



Apothécie de type Lécidéine

D'après British Lichens  
(<http://www.lichens.lastdragon.org>)

**Rhizines** : Manchons ou faisceaux plus ou moins compacts d'hyphes assurant l'adhésion du thalle à son substrat (particularité quasi exclusive des thalles foliacés).

**Schizidies** : Propagules de multiplication végétative, en forme d'écaille, prenant naissance par fissuration de la partie supérieure du thalle lichénique.

**Soralies** : Amas granuleux de médulle libérée par une déchirure du cortex du thalle lichénique.

**Sorédies** : granules élaborés par le thalle lichénique, constitués d'hyphes fongiques et d'algues, elles permettent la reproduction végétative des lichens en disséminant ensemble, les deux partenaires de la symbiose

**Spinules** : Prolongements épais et rigides, plus ou moins en forme d'épine, formés de plusieurs hyphes agglomérés.

**Thalles** : Parties végétatives du lichen.

**Tomentum** : Ensemble des poils.

**Veines** : Nervures.

# Liste des figures

<u>Figure 1</u> : Schéma général de l'étude.....	6
<u>Figure 2</u> : Photographies au microscope électronique à transmission (LTSEM) de structure homéomère (A).....	19
<u>Figure 3</u> : Représentations schématiques de certains organes reproducteurs et non reproducteurs <sup>56</sup> .....	20
<u>Figure 4</u> : A. Cycle théorique de reproduction des lichens : phase végétative et sexuée ( <a href="http://home.cc.umanitoba.ca/~pierceyn/lifecycle.html">http://home.cc.umanitoba.ca/~pierceyn/lifecycle.html</a> ) et B. Germination des spores lichéniques (spores uni ou bicellulaires : A à C ; spores géantes : D ; jeune mycélium : E ; Gonidies : F ; Fragments d'hyménium : G et Germination de deux spores : H) <sup>43</sup> .....	21
<u>Figure 5</u> : Photographies des différents haustoria (A. haustorium intracellulaire, B. haustorium intermédiaire et C. haustorium intrapariétal) observés au microscope électronique à balayage.....	23
<u>Figure 6</u> : Illustration schématique des échanges au sein de la symbiose lichénique : photobionte et mycobionte.....	23
<u>Figure 7</u> : Voies de biosynthèse des métabolites spécifiques lichéniques illustrées par quelques familles et métabolites spécifiques caractéristiques modifiées et simplifiées <sup>59</sup> .....	25
<u>Figure 8</u> : Classification des 5 genres lichéniques étudiés (d'après Taxonomy Browser, NCBI).....	27
<u>Figure 9</u> : Coupe transversale de <i>Rocella fuciformis</i> colorée au bleu coton et observée au microscope optique (Grossissement x 400).....	28
<u>Figure 10</u> : Coupe transversale de <i>Rocella phycopsis</i> colorée au bleu coton et observée au microscope optique (Grossissement x 400).....	28
<u>Figure 11</u> : Structures des métabolites primaires et spécialisés décrits pour <i>R. fuciformis</i> & <i>R. phycopsis</i> .....	33
<u>Figure 12</u> : Structures des métabolites primaires et spécialisés décrits pour <i>L. confinis</i> & <i>L. pygmaea</i> .....	35
<u>Figure 13</u> : Structures des métabolites primaires et spécialisés décrits pour <i>Collema cristatum</i> .....	36
<u>Figure 14</u> : Schéma récapitulatif de la partie 2 - Etudes lichéniques.....	41
<u>Figure 15</u> : Droites d'étalonnages de l'érythrine (A) et de l'acide léprarique (B) obtenues par CLHP.....	44
<u>Figure 16</u> : Effets de chaque paramètre testé sur les différents rendements considérés pour l'optimisation.....	46
<u>Figure 17</u> : Chromatogrammes UV (280 nm) de <i>R. phycopsis</i> et de <i>R. fuciformis</i> .....	48
<u>Figure 18</u> : Chromatogrammes de masse (« base peak ») en mode négatif de <i>R. phycopsis</i> et de <i>R. fuciformis</i> ..	49
<u>Figure 19</u> : Spectres de masses ([M-H] <sup>-</sup> m/z) de <i>R. fuciformis</i> .....	50
<u>Figure 20</u> : Spectres de masses ([M-H] <sup>-</sup> m/z) de <i>R. phycopsis</i> .....	50
<u>Figure 21</u> : Spectres de masse ([M-H] <sup>-</sup> m/z) et schéma de fragmentation des métabolites spécifiques de <i>R. fuciformis</i> & <i>R. phycopsis</i> (A - érythrine, B - acide lécanorique, C - acide roccellique, D - montagnétol).....	52
<u>Figure 22</u> : Spectres MS/MS de l'ion [M+H] <sup>+</sup> m/z 363 et schéma de fragmentation de l'acide léprarique isolé de <i>R. fuciformis</i> .....	53
<u>Figure 23</u> : Schéma général de fragmentation de l'acide léprarique ([M+H] <sup>+</sup> m/z 363).....	54
<u>Figure 24</u> : Similarités des voies de fragmentation des 3 métabolites dérivant de l'orcinol.....	54
<u>Figure 25</u> : Chromatogrammes UV (total scan) de CA ( <i>C. auriforme</i> ), CC ( <i>C. cristatum</i> ), CF ( <i>C. fuscovirens</i> ), LC ( <i>L. confinis</i> ), LP ( <i>L. pygmaea</i> ), LL ( <i>Leptogium lichenoïdes</i> ) et SS ( <i>S. symphorea</i> ).....	56
<u>Figure 26</u> : Chromatogrammes de masse (base peak) en mode positif de CA ( <i>C. auriforme</i> ), CC ( <i>C. cristatum</i> ), CF ( <i>C. fuscovirens</i> ), LC ( <i>L. confinis</i> ), LP ( <i>L. pygmaea</i> ), LL ( <i>Leptogium lichenoïdes</i> ) et SS ( <i>S. symphorea</i> ).....	56
<u>Figure 27</u> : Structure et spectre UV (analyse LC/MS) de la mycosporine sérinol.....	58
<u>Figure 28</u> : Spectre MS et MS/MS de la mycosporine sérinol.....	58
<u>Figure 29</u> : Visualisation par Cytoscape des interconnexions des spectres de masses de l'ensemble des espèces lichéniques étudiées.....	60
<u>Figure 30</u> : Visualisation par Cytoscape des interconnexions des spectres de masses de <i>Rocella fuciformis</i> , <i>R. phycopsis</i> et de l'érythrine.....	61
<u>Figure 31</u> : Spectres de masse ([M+H] <sup>+</sup> m/z) du thalle intact (A) et broyé (B) acquis au cours de l'analyse de type DART.....	62
<u>Figure 32</u> : Zoom du spectre de masse ([M+H] <sup>+</sup> m/z) du thalle intact acquis au cours de l'analyse de type DART.....	63
<u>Figure 33</u> : Schéma d'extraction, de fractionnement et de purification des différents extraits de <i>R. fuciformis</i> ..	65
<u>Figure 34</u> : Structure du (+)-acétylportentol (RF1).....	66
<u>Figure 35</u> : Structures de l'acide léprarique (RF2) et de la (+)-érythrine (RF3).....	68
<u>Figure 36</u> : Structure du méso-érythritol (RF4).....	69
<u>Figure 37</u> : A. Structure de la choline sulfate (RF5), du montagnétol (RF6) et de l'orsellinate de méthyle (RF7) ..	70
<u>Figure 38</u> : Schéma d'isolement, de fractionnement et de purification des différents extraits de <i>R. phycopsis</i> ....	72



<u>Figure 39</u> : Structure de l'acide roccellique (RP1) .....	73
<u>Figure 40</u> : Structure de l'acide lécanorique (RP2).....	74
<u>Figure 41</u> : Photographies de <i>R. fuciformis</i> avant et après réactions thallines (échelle : 1 cm).....	75
<u>Figure 42</u> : Tests des réactifs thallins (réactifs C et K) sur les composés spécifiques majoritaires de <i>R. fuciformis</i> et structures chimiques de ces métabolites (A. (+)-acétylportentol, B. (+)-érythrine et C. acide lépranique).....	76
<u>Figure 43</u> : Spectres de masse ([M-H] <sup>-</sup> m/z, mode négatif) des différentes parties du thalle lichénique (Cortex, Médulle et Soralies) de <i>R. fuciformis</i> .....	77
<u>Figure 44</u> : Photographies de <i>R. phycopsis</i> avant et après réactions thallines (échelle : 1 cm).....	78
<u>Figure 45</u> : Tests des réactifs thallins (réactifs C et K) sur les composés spécifiques majoritaires de <i>R. phycopsis</i> et structures chimiques de ces métabolites (A. (+)-érythrine et B. (+)- acide roccellique) .....	78
<u>Figure 46</u> : Spectres de masse ([M-H] <sup>-</sup> m/z, mode négatif) des différentes parties du thalle lichénique (Cortex, Médulle et Soralies) de <i>R. phycopsis</i> .....	79
<u>Figure 47</u> : Proportion (en %) de chacun des composés isolés de <i>Rocella fuciformis</i> et <i>R. phycopsis</i> .....	81
<u>Figure 48</u> : Voies d'interconnexions de l'érythrine, de l'acide lécanorique, du montagnétol et des dérivés orcinol .....	81
<u>Figure 49</u> : Spectres de masse (mode négatif) et intensité du pic du montagnétol ([M-H] <sup>-</sup> m/z 271) selon le solvant d'extraction .....	82
<u>Figure 50</u> : Représentation graphique du pouvoir piégeant de l'anion superoxyde par les produits (en rouge : témoins positifs).....	83
<u>Figure 51</u> : Arbre du vivant basé sur l'ARNr 16S.....	95
<u>Figure 52</u> : Composition de l'enveloppe cellulaire des bactéries de type Gram + et Gram -.....	96
<u>Figure 53</u> : (A) Photographie de <i>Stereocaulon montagneanum</i> et (B) Microscopie électronique à balayage de la surface lichénique supérieure de <i>Stereocaulon montagneanum</i> montrant les communautés bactériennes épilitiques associées <sup>99</sup> .....	97
<u>Figure 54</u> : Communautés bactériennes associées à <i>Cladonia arbuscula</i> et à <i>Cetraria islandica</i> visualisées par FISH/CLSM <sup>30</sup> .....	98
<u>Figure 55</u> : Proportion de différents phyla bactériens associés à des lichens selon leur localisation au sein du lichen et l'âge du lichen <sup>102</sup> .....	103
<u>Figure 56</u> : Analyses fonctionnelles partielles des procaryotes de <i>Peltigera membranacea</i> <sup>100</sup> .....	104
<u>Figure 57</u> : Métabolites isolés de souches bactériennes associées à des lichens .....	106
<u>Figure 58</u> : Schéma général des interactions possibles au sein du lichen comme entité mini-écosystème.....	107
<u>Figure 59</u> : Schéma général de la partie 2 (Chapitre 2) - Communautés bactériennes associées : diversité bactérienne et études chimique .....	111
<u>Figure 60</u> : Caractéristiques des lieux de récolte des quatre espèces lichéniques étudiées.....	112
<u>Figure 61</u> : Diversité cultivable des communautés bactériennes associées à <i>Collema auriforme</i> , <i>Lichina confinis</i> , <i>L. pygmaea</i> et <i>Rocella fuciformis</i> . Proportion (en %) et représentation de type Cytoscape par espèce lichénique .....	115
<u>Figure 62</u> : Représentation Unifrac et clusters des OTUs observés au sein des familles des Actinobacteria .....	117
<u>Figure 63</u> : Pourcentage (%) des genres bactériens isolés selon (A) le milieu de culture et (B) selon leur localisation au sein du thalle lichénique .....	118
<u>Figure 64</u> : A. Impact du milieu de culture et B. Impact de la localisation sur la diversité bactérienne cultivable (genres bactériens) associée à <i>Lichina confinis</i> .....	119
<u>Figure 65</u> : Proportion des OTUs de chaque famille d'Actinobacteria PKS I et/ou PKS II positifs .....	120
<u>Figure 66</u> : Cycle de développement du genre <i>Streptomyces</i> .....	122
<u>Figure 67</u> : Illustrations de différents types structuraux produits par le genre <i>Streptomyces</i> .....	124
<u>Figure 68</u> : Photographies des tests antimicrobiens effectués par la technique de la gélose molle sur MOLA1488 vis-à-vis de (A) <i>P. aeruginosa</i> , (B) <i>S. epidermidis</i> CIP8155, (C) <i>S. epidermidis</i> CIP 6821 et (D) <i>S. aureus</i> . .....	125
<u>Figure 69</u> : Chromatogrammes UV (A) et de masse en mode positif (B) de l'extrait AcOEt de MOLA1488 .....	126
<u>Figure 70</u> : Spectres UV de trois métabolites (*) présents dans l'extrait AcOEt de MOLA1488.....	126
<u>Figure 71</u> : Spectre de masse ([M+H] <sup>+</sup> m/z) de l'extrait AcOEt de MOLA1488.....	127
<u>Figure 72</u> : Schéma de séparation et d'isolement des composés issus des deux cultures de MOLA1488 en milieu liquide Luria Broth (LB).....	129
<u>Figure 73</u> : Structures de composés D2, D7, D8 et D10 isolés de MOLA1488 .....	130
<u>Figure 74</u> : Structure de la N-Me-Dactinomycine (D9, D13).....	132
<u>Figure 75</u> : Structure de l'acide usnique (D14).....	133
<u>Figure 76</u> : Schéma de fragmentation de l'acide usnique (D14).....	134
<u>Figure 77</u> : Spectre <sup>1</sup> H-RMN (CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ) du composé D12 isolé de MOLA1488 à 500 MHz.....	135

<u>Figure 78</u> : Spectre jmod (CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ) du composé D12 isolé de MOLA1488 à 125 MHz .....	136
<u>Figure 79</u> : Structure des fragments (a, b et c) du composé D12 .....	136
<u>Figure 80</u> : Spectres RMN 2D (CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ) du composé D12 isolé de MOLA1488 à 500 MHz. (A) COSY et (B) HMBC .....	137
<u>Figure 81</u> : Structure du composé D12 isolé de MOLA1488 (flèches : corrélations HMBC et traits : corrélations COSY) .....	137
<u>Figure 82</u> : Schéma de fragmentation du composé D12 .....	138
<u>Figure 83</u> : Structure chimique de la bactériochlorophylle A .....	140
<u>Figure 84</u> : Photographies des tests antimicrobiens effectués par la technique de la gélose molle sur MOLA1416 vis-à-vis de (A) <i>S. epidermidis</i> CIP8155, (B) <i>S. epidermidis</i> CIP 6821 et (C) <i>S. aureus</i> CIP 4.38. ....	140
<u>Figure 85</u> : Chromatogrammes UV (A) et de masse en mode positif (B) de l'extrait AcOEt de MOLA1416 .....	142
<u>Figure 86</u> : Spectre de masse ([M+H] <sup>+</sup> m/z) de l'extrait AcOEt de MOLA1416.....	142
<u>Figure 87</u> : Schéma de séparation et d'isolement des composés issus des deux cultures de MOLA1416 réalisées dans le milieu MB (Marine Broth).....	144
<u>Figure 88</u> : Structures de composés R1 et R5 isolés de MOLA1416 .....	145
<u>Figure 89</u> : Spectre <sup>1</sup> H-RMN (CDCl <sub>3</sub> ) du composé R11 isolé de MOLA1416 à 500 MHz .....	146
<u>Figure 90</u> : Spectre jmod (CDCl <sub>3</sub> ) du composé R11 isolé de MOLA1416 à 125 MHz .....	147
<u>Figure 91</u> : Structure des fragments (a, b et c) du composé R11.....	147
<u>Figure 92</u> : Spectre HMBC du composé R11 isolé de MOLA1416 à 500 MHz.....	148
<u>Figure 93</u> : Structure du composé R11 isolé de MOLA1416 (flèches : corrélations HMBC) (numérotation choisie arbitrairement) .....	148
<u>Figure 94</u> : Schéma de fragmentation du composé R11 .....	149
<u>Figure 95</u> : Structures de composés identifiés à partir de la base de données GnPs.....	153
<u>Figure 96</u> : (A) Spectres de masses ([M+H] <sup>+</sup> m/z) de DP1 et MOLA1488 et (B) représentation cytoscape des interconnexions des spectres de masse de ces deux espèces bactériennes.....	154
<u>Figure 97</u> : (A) Spectres de masses ([M+H] <sup>+</sup> m/z) de MOLA1416 et (B) représentation cytoscape des interconnexions des spectres de masse de cette souche bactérienne.....	155
<u>Figure 98</u> : (A) Spectres de masses ([M+H] <sup>+</sup> m/z) de MOLA1448, MOLA1522 et DP94 (B) Spectres de masses ([M+H] <sup>+</sup> m/z) de MOLA1450 ainsi que la représentation cytoscape des interconnexions des spectres de masse de ces différentes espèces bactériennes .....	156
<u>Figure 99</u> : (A) Spectres de masses ([M+H] <sup>+</sup> m/z) de MOLA1528 et MOLA1554 (B) Spectres de masses ([M+H] <sup>+</sup> m/z) de MOLA1545 ainsi que la représentation cytoscape des interconnexions des spectres de masse de ces différentes espèces bactériennes.....	157
<u>Figure 100</u> : Schéma général de la partie 3- Extraits lichéniques/bactéries associées.....	163
<u>Figure 101</u> : Profils des courbes de réduction du MTT des cultures des quatre souches bactériennes selon leur facteur de dilution (non diluées (ND), dilution au 1/2 (2), au 1/5 (5) et dilution au 1/100 (100)).....	165
<u>Figure 102</u> : Droites d'étalonnages de réduction du MTT pour chacune des quatre souches bactériennes .....	166
<u>Figure 103</u> : Courbes de croissance des quatre souches bactériennes en présence ou non d'un composé lichénique .....	167
<u>Figure 104</u> : Extraits de chromatogramme (0 à 12 min) à 280 nm des extraits à l'AcOEt des 4 souches bactériennes en absence de composés lichéniques .....	168
<u>Figure 105</u> : Extraits de chromatogramme (0 à 12 min) à 280 nm des extraits à l'AcOEt des 4 souches bactériennes en présence d'érythrine.....	168
<u>Figure 106</u> : Extraits de chromatogramme (0 à 12 min) à 280 nm des extraits à l'AcOEt des 4 souches bactériennes en présence d'acide léprarique.....	169
<u>Figure 107</u> : Extraits de chromatogramme (0 à 12 min) à 280 nm des extraits à l'AcOEt des 4 souches bactériennes en présence d'acétylportentol .....	170
<u>Figure 108</u> : Extraits de chromatogramme (0 à 12 min) à 280 nm des extraits à l'AcOEt des 4 souches bactériennes en présence de méso-érythritol .....	171
<u>Figure 109</u> : Profils HPLC et UV de l'acide léprarique (tampon phosphate pH7 et acétone) à 280 nm (A) et spectres de masses en mode négatif ([M-H] <sup>-</sup> m/z) de ces deux mêmes extraits et du tampon phosphate pH7 (B) .....	172
<u>Figure 110</u> : Chromatogramme à 280 nm de l'extrait AcOEt de MOLA1545 J15.....	173
<u>Figure 111</u> : Spectres de masses ([M-H] <sup>-</sup> m/z) des différentes étapes de dégradation de l'érythrine par ces quatre bactéries associées à <i>Rocella fuciformis</i> .....	174
<u>Figure 112</u> : Schéma de dégradation de l'érythrine et enzymes impliquées.....	174
<u>Figure 113</u> : Structure du DPPH .....	197

<i>Figure 114 : Réaction du test anti-oxydant de piégeage de l'anion superoxyde .....</i>	<i>198</i>
<i>Figure 115 : Schéma récapitulatif du protocole d'extraction des cultures bactériennes.....</i>	<i>214</i>
<i>Figure 116 : Structures des deux composés synthétisés pour l'optimisation des conditions de masse .....</i>	<i>215</i>

# Liste des tableaux

Tableau 1 : Représentation des différents types de thalles lichéniques .....	18
Tableau 2 : Paramètres et niveaux du plan de la méthode Taguchi (Plan orthogonal $L_9$ ) .....	43
Tableau 3 : Choix des expériences en fonction du plan orthogonal $L_9$ .....	43
Tableau 4 : Conditions du plan d'expérience ( $L_9$ ) et des expériences complémentaires (10 et 11) et détermination des rendements d'extraction totaux (%), d'érythrine (%) et d'acide lépranique (%) $\pm$ SD (dévi- ation standard). .....	46
Tableau 5 : Récapitulatif des données LC-ESI-MS/MS (temps de rétention ( $t_R$ ), longueurs d'onde maximales, rapport $[M-H]^+ m/z$ et ions produits (MS/MS) associés à leur intensité relative (I.R %) respective) .....	49
Tableau 6 : Récapitulatif des données LC-ESI-MS/MS (temps de rétention (RT), longueurs d'onde d'absorption maximale, rapport $[M+H]^+ m/z$ et ions produits (MS/MS)).....	57
Tableau 7 : Récapitulatif des données obtenues par spectrométrie de masse de type DART .....	63
Tableau 8 : Données spectrales RMN (ppm) du (+)-acétylportentol (RF1) dans le $CDCl_3$ à 300 MHz .....	67
Tableau 9 : Données spectrales RMN (ppm) de l'acide lépranique (RF2) ( $CDCl_3$ ) à 300 MHz et de l'érythrine (RF3) ( $DMSO-d_6$ ) à 500 MHz .....	68
Tableau 10 : Données spectrales RMN (ppm) du méso-érythritol dans le $DMSO-d_6$ à 500 MHz.....	69
Tableau 11 : Données spectrales RMN (ppm) du montagnétol (RF6) ( $CD_3)_2CO$ ) et de l'orsellinate de méthyle (RF7) ( $CD_3)_2CO$ ) à 300 MHz.....	71
Tableau 12 : Données spectrales RMN (ppm) de l'acide roccellique (RP1) dans $CD_3OD$ à 500 MHz .....	73
Tableau 13 : Données spectrales RMN (ppm) de l'acide lécanorique (RP2) dans le $(CD_3)_2CO$ à 300 MHz .....	74
Tableau 14 : Bilan des métabolites isolés des deux espèces du genre <i>Rocella</i> (structures, quantités et codes des composés).....	80
Tableau 15 : Tableau récapitulatif des différents composés testés .....	82
Tableau 16 : Activités anti-radicalaires des produits (en rouge : témoins phénoliques positifs).....	83
Tableau 17 : Pouvoir piégeant de l'anion superoxyde des produits (en rouge : témoins positifs).....	83
Tableau 18 : Résultats de la $Cl_{50}$ ( $\mu M$ ) sur A375m, A375p, HaCaT et B16-F10 des composés (en rouge : témoins positifs) .....	84
Tableau 19 : Résultats de viabilité (en %) à 25 $\mu M$ obtenues sur les 8 lignées cellulaires testées sur la plateforme ImPACcell (en rouge : témoins positifs).....	84
Tableau 20 : Tests antibactériens réalisés à partir de différents composés purs et extraits de <i>R. fuciformis</i> et <i>R. phycopsis</i> à 50 mg/mL.....	85
Tableau 21 : Récapitulatif des études rapportant des espèces bactériennes associées aux lichens selon les espèces lichéniques et le type de méthodes utilisées .....	100
Tableau 22 : Ensemble des souches bactériennes cultivables positifs par le test en gélose molle : Propriétés antibactériennes (24 h d'incubation).....	121
Tableau 23 : $Cl_{50}$ de l'extrait AcOEt de MOLA1488 .....	125
Tableau 24 : CMI (en $\mu g/mL$ ) de l'extrait AcOEt de MOLA1488 sur 5 cibles bactériennes pathogènes.....	125
Tableau 25 : Données spectrales RMN (ppm) des composés D2, D7, D8 et D10 dans le $CDCl_3$ à 500 MHz.....	131
Tableau 26 : Données spectrales RMN (ppm) de la N-Me-dactinomycine ( $CDCl_3$ ) à 500 MHz et 125 MHz .....	133
Tableau 27 : Données spectrales RMN (ppm) de l'acide usnique (D14) à 500 MHz et 125 MHz.....	134
Tableau 28 : Données spectrales RMN (ppm) et corrélations du composé D12 ( $CD_2Cl_2$ , 500 MHz) .....	138
Tableau 29 : Résultats de la viabilité (%) à 25 $\mu M$ obtenues sur 8 lignées cellulaires testées au sein de la plateforme ImPACcell (témoins en rouge) .....	139
Tableau 30 : $Cl_{50}$ de l'extrait à l'AcOEt de MOLA1416 .....	141
Tableau 31 : CMI (en $\mu g/mL$ ) de l'extrait à l'AcOEt de MOLA1416 sur 5 cibles bactériennes pathogènes .....	141
Tableau 32 : Données spectrales (ppm) du composé R1 dans le $CDCl_3$ à 500 MHz.....	145
Tableau 34 : Données spectrales RMN (ppm) et corrélations du composé R11 isolé de MOLA1416 ( $CD_2Cl_2$ , 500 MHz).....	148
Tableau 34 : $Cl_{50}$ du composé R1 isolé de MOLA1416.....	150
Tableau 35 : Résultats de la $Cl_{50}$ ( $\mu g/mL$ ) sur HaCaT et B16-F10 des dix extraits à l'AcOEt bactériens (48h d'incubation).....	151
Tableau 36 : CMI des extraits à l'AcOEt issus des dix souches bactériennes testées .....	151
Tableau 37 : Conditions d'élution utilisées pour les lichens à algues vertes ( <i>Rocella fuciformis</i> & <i>R. phycopsis</i> ) <sup>137</sup> .....	195

Tableau 38 : Conditions d'élution utilisées pour les cyanolichens <sup>87</sup> .....	195
Tableau 39 : Récapitulatif du protocole d'isolement des communautés bactériennes cultivables associées à <i>L. confinis</i> (LC), <i>L. pygmaea</i> (LP) et <i>R. fuciformis</i> (RF).....	209
Tableau 40 : Récapitulatif du protocole utilisé pour l'isolement des communautés bactériennes cultivables associées à <i>C. auriforme</i> .....	209
Tableau 41 : Amorces et conditions PCR utilisées pour l'ADNr 16S.....	210
Tableau 42 : Amorces utilisées pour la réaction de séquence à partir de l'ADNr 16S.....	210
Tableau 43 : Conditions PCR utilisées pour la réaction de séquence à partir de l'ADNr 16S.....	211
Tableau 44 : Amorces et conditions PCR utilisées pour l'ADNr 16S.....	211
Tableau 45 : Conditions d'élution utilisées.....	215
Tableau 46 : Gradient d'élution utilisé pour la bioconversion de l'acide léprarique (Autriche).....	225
Tableau 47 : Gradient d'élution utilisé pour le profilage chimique en présence de métabolites lichéniques et pour la bioconversion de l'érythrine (Rennes).....	225

# Liste des annexes

---

Annexe 1 : Résultats des tests statistiques (ANOVA) de l'optimisation des conditions d'extraction des lichens.	241
Annexe 2 : Spectres RMN <sup>1</sup> H (500 MHz) et <sup>13</sup> C (125 MHz) de l'acétylportentol dans le CDCl <sub>3</sub> .....	242
Annexe 3 : Spectre RMN <sup>1</sup> H (300 MHz) de l'acide léprarique dans le CDCl <sub>3</sub> .....	243
Annexe 4 : Spectres RMN <sup>1</sup> H (500 MHz) et <sup>13</sup> C (125 MHz) de l'érythrine dans le DMSO-d <sub>6</sub> .....	244
Annexe 5 : Spectres RMN <sup>1</sup> H (500 MHz) et <sup>13</sup> C du méso-érythritol dans le DMSO-d <sub>6</sub> .....	245
Annexe 6 : Spectre RMN <sup>1</sup> H (300 MHz) du montagnétol dans le (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO .....	246
Annexe 7 : Spectre RMN <sup>1</sup> H (300 MHz) de l'orsellinate de méthyle dans le (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO .....	247
Annexe 8 : Spectres RMN <sup>1</sup> H (500 MHz) et <sup>13</sup> C (125 MHz) de l'acide roccellique dans le CD <sub>3</sub> OD.....	248
Annexe 9 : Spectre RMN <sup>1</sup> H (300 MHz) de l'acide lécanorique dans le (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO.....	249
Annexe 10 : Liste des différentes souches bactériennes isolées de quatre lichens selon les conditions de culture : milieu (MA: Marine Agar media, AIA: Actinomycetes Isolation Agar media et ISP2: International Streptomyces Project 2 Agar media) et leur localisation (lavage : Wash et Homogénat : Homogenate).....	250
Annexe 11 : Récapitulatif des OTUs des échantillons (construit avec Biom file) .....	258
Annexe 12 : Spectres RMN <sup>1</sup> H (500 MHz) et <sup>13</sup> C (125 MHz) du composé D2 dans le CDCl <sub>3</sub> .....	260
Annexe 13 : Spectres RMN <sup>1</sup> H (500 MHz) et jmod du composé D7 dans le CDCl <sub>3</sub> .....	261
Annexe 14 : Spectres RMN <sup>1</sup> H (500 MHz) et jmod du composé D8 et R2 dans le CDCl <sub>3</sub> .....	262
Annexe 15 : Spectres RMN <sup>1</sup> H (500 MHz) et jmod du composé D10 dans le CDCl <sub>3</sub> .....	263
Annexe 16 : Spectres RMN <sup>1</sup> H (500 MHz) et jmod du composé D9 dans le CDCl <sub>3</sub> .....	264
Annexe 17 : Spectres RMN <sup>1</sup> H (500 MHz), jmod, COSY, TOCSY, HSQC et HMBC- du composé D12 dans le CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> .....	265
<b>Annexe 18 : Spectres RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et jmod du composé R1 dans le CDCl<sub>3</sub>.....</b>	<b>268</b>
Annexe 19 : Spectres RMN <sup>1</sup> H (500 MHz) jmod, COSY, HMBC du composé R11 dans le CDCl <sub>3</sub> .....	269





# *Introduction*

---



# INTRODUCTION.

En raison de la diminution de l'efficacité des antibiotiques actuels et des médicaments anticancéreux, la recherche de nouveaux médicaments est toujours un objectif prioritaire pour lutter contre les infections bactériennes et le cancer. De plus, l'émergence de nouveaux pathogènes augmentent les besoins de trouver de nouveaux composés bioactifs.<sup>1-3</sup>

La majorité des produits naturels actifs sont à l'heure actuelle produits et isolés de micro-organismes (environ 23000 produits naturels bioactifs).<sup>4</sup> Certains procaryotes ont montré un fort potentiel dans la recherche de molécules bioactives.<sup>5</sup> En l'occurrence, les souches bactériennes membres du phylum des *Actinobacteria* ont un palmarès inégalé comme source de molécules bioactives (45% de tous les produits bioactifs microbiens découverts).<sup>6</sup> De plus, environ 7600 métabolites d'intérêts sont produits par un seul genre bactérien : *Streptomyces* sp. Depuis la découverte de la streptomycine, ces souches ont été isolées à partir de diverses sources.<sup>7</sup> D'autre part, avec l'accroissement des connaissances en écologie microbienne, il est maintenant reconnu que les *Actinobacteria* isolées des écosystèmes sous-étudiés sont de nouvelles sources pour la découverte de nouveaux métabolites bioactifs.

Jusqu'à présent, la plupart des *Actinobacteria* sont et ont été isolés d'environnements terrestres, en particulier du sol.<sup>4</sup> Le milieu marin n'est cependant pas à exclure comme source prometteuse pour la recherche de molécules d'intérêts.<sup>8,9</sup> En effet, de nombreuses nouvelles structures chimiques sont découvertes à partir d'*Actinobacteria* marines.<sup>10-12</sup> Bien que les systèmes côtiers soient encore peu étudiés, quelques études récentes ont été toutefois menées.<sup>13-15</sup> Dans ce contexte, les études ont été effectuées surtout à partir de systèmes de sable côtier et de la rhizosphère.

<sup>1</sup>Silver, L. L. (2011) *Clinical Microbiology Reviews* 24, 71–109.

<sup>2</sup>Frieden, T. (2013) *Centers for Disease Control and Prevention*, p 114.

<sup>3</sup>Fukuda, K. (2014) *Antimicrobial resistance Global report on surveillance*, World Health Organization, France, p 256.

<sup>4</sup>Bérdy, J. (2005) *Journal of Antibiotics* 58, 1–26.

<sup>5</sup>Demain, A. L., and Fang, A. (2000) *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology* 69, 1–39.

<sup>6</sup>Jose, P. A., Robinson, S., and Jebakumar, D. (2013) *Frontiers in Microbiology* 4, 2008–2010.

<sup>7</sup>Koehn, F. E., and Carter, G. T. (2005) *Nature Reviews Drug Discovery* 4, 206–220.

<sup>8</sup>Fiedler, H.-P., Bruntner, C., Bull, A. T., Ward, A. C., Goodfellow, M., Potterat, O., Puder, C., and Mihm, G. (2005) *Antonie Van Leeuwenhoek* 87, 37–42.

<sup>9</sup>Bull, A. T., Stach, J. E. M., Ward, A. C., and Goodfellow, M. (2005) *Antonie Van Leeuwenhoek* 87, 65–79.

<sup>10</sup>Fu, P., Johnson, M., Chen, H., Posner, B. A., and Macmillan, J. B. (2014). *Journal of Natural Products* 77, 1245–1248

<sup>11</sup>Goodfellow, M., Stach, J. E. M., Brown, R., Bonda, A. N. V., Jones, A. L., Mexson, J., Fiedler, H.-P., Zucchi, T. D., and Bull, A. T. (2012) *Antonie Van Leeuwenhoek* 101, 185–193.

<sup>12</sup>Oh, D.-C., Williams, P. G., Kauffman, C. A., Jensen, P. R., and Fenical, W. (2006) *Organic Letters* 8, 1021–1024.

<sup>13</sup>Antony-Babu, S., Stach, J. E. M., and Goodfellow, M. (2008) *Antonie Van Leeuwenhoek* 94, 63–74.

<sup>14</sup>Watson, E. T., and Williams, S. T. (1974) *Soil Biology & Biochemistry* 6, 43–52.

<sup>15</sup>Hong, K., Gao, A.-H., Xie, Q.-Y., Gao, H., Zhuang, L., Lin, H.-P., Yu, H.-P., Li, J., Yao, X.-S., Goodfellow, M., and Ruan, J.-S. (2009) *Marine Drugs* 7, 24–44.

Parmi les sources côtières peu explorées les lichens marins et maritimes y sont uniques. Comme leurs partenaires terrestres, les lichens marins et maritimes correspondent à l'association symbiotique entre un photobionte (algues vertes et/ou cyanobactéries) et une grande diversité d'espèces de champignons épi et endolichéniques (1500 espèces rapportées).<sup>16–19</sup> De plus les lichens sont remarquables dans leur capacité à produire des métabolites secondaires spécifiques par diverses voies de biosynthèse, y compris les voies de l'acide mévalonique, polyacétate et / ou de l'acide shikimique. Près de 1050 métabolites ont déjà été décrits.<sup>20</sup> Certains de ces métabolites présentent des activités biologiques par exemple antioxydantes, cytotoxiques ou encore des propriétés antimicrobiennes.<sup>20–24</sup>

Plus récemment, plusieurs études ont montré la prévalence de bactéries associées aux lichens (7.10<sup>9</sup> bactéries par gramme de lichen sec).<sup>25–34</sup> Parmi ces communautés bactériennes, certaines ont également souligné la présence d'*Actinobacteria* (*Micromonosporaceae*, *Streptomycetaceae*, *Cellulomonadaceae*, *Microbacteriaceae* et *Streptosporangiaceae*) démontrant ainsi que les lichens sont une source potentielle d'*Actinobacteria*.<sup>29</sup> Cependant, d'autres phyla bactériens, en particulier, des *Firmicutes* (par exemple *Bacillus* sp., *Clostridium* sp) et des *Proteobacteria* (par exemple *Azotobacter* sp., *Pseudomonas* sp.) mais avec une dominance d'*Alphaproteobacteria* (plus de 60% de tous les *Proteobacteria* associés aux lichens) ont été régulièrement mis en évidence (par exemple *Beijerinckia* sp.).<sup>30</sup>

Bien que peu de publications aient étudié la présence de bactéries cultivables associées aux lichens, quelques souches bactériennes ont été décrites : *Streptomyces uncialis* isolé de *Cladonia uncialis* et *Schumannella luteola* sp. nov, *Leifsonia lichenia* sp. nov et *Nocardioides exalbidus* sp. nov à partir de lichens non identifiés récoltés au Japon.<sup>35–38</sup> Ainsi, très peu d'informations sont disponibles concernant les communautés bactériennes associées aux lichens marins à l'exception d'une espèce lichénique (*Hydropunctaria maura*).<sup>39</sup>

<sup>16</sup>Lawrey, J. D., and Diederich, P. (2003) *The Bryologist* 106, 80–120.

<sup>17</sup>Muggia, L., Gueidan, C., Knudsen, K., Perlmutter, G., and Grube, M. (2013) *Mycopathologia* 175, 523–35.

<sup>18</sup>Honegger, R. (2012) *The mycota IX*, pp 287–339.

<sup>19</sup>Hoffman, M. T., and Arnold, A. E. (2010) *Applied and Environmental Microbiology* 76, 4063–75.

<sup>20</sup>Molnár, K., and Farkas, E. (2010) *Zeitschrift für Naturforschung C*. 65, 157–73.

<sup>21</sup>Ingolfsson, K. (2002) *Phytochemistry* 61, 729–736.

<sup>22</sup>Lauterwein, M., Oethinger, M., Belsner, K., Peters, T., and Marre, R. (1995) *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 39, 2541–2543.

<sup>23</sup>Shukla, V., Joshi, G. P., and Rawat, M. S. M. (2010) *Phytochemistry Reviews* 9, 303–314.

<sup>24</sup>Shrestha, G., and St. Clair, L. L. (2013) *Phytochemistry Reviews* 12, 229–244.

<sup>25</sup>Bates, S. T., Cropsey, G. W. G., Caporaso, J. G., Knight, R., and Fierer, N. (2011) *Applied and Environmental Microbiology* 77, 1309–14.

<sup>26</sup>Cardinale, M., Berg, G., Grube, M., Vieira de Castro, J., and Müller, H. (2008) *FEMS Microbiology Ecology* 66, 63–71.

<sup>27</sup>González, I., Ayuso-Sacido, A., Anderson, A., and Genilloud, O. (2005) *FEMS Microbiology Ecology* 54, 401–15.

<sup>28</sup>Cardinale, M., Grube, M., Castro, J. V., Müller, H., and Berg, G. (2012) *FEMS Microbiology Letters* 329, 111–5.

<sup>29</sup>Cardinale, M., Puglia, A. M., and Grube, M. (2006) *FEMS Microbiology Ecology* 57, 484–495.

<sup>30</sup>Grube, M., and Berg, G. (2009) *Fungal Biology Reviews* 23, 72–85.

<sup>31</sup>Grube, M., Cardinale, M., De Castro, J. ., Mu, H., and Berg, G. (2009) *ISME International Society for Microbial Ecology* 3, 1105–1115.

<sup>32</sup>Hodkinson, B. P., and Lutzoni, F. (2010) *Symbiosis* 49, 163–180.

<sup>33</sup>Liba, C. M., Ferrara, F. I. S., Manfio, G. P., Fantinatti-Garboggini, F., Albuquerque, R. C., Pavan, C., Ramos, P. L., Moreira-Filho, C. a, and Barbosa, H. R. (2006) *Journal of Applied Microbiology* 101, 1076–86.

<sup>34</sup>Muggia, L., Klug, B., Berg, G., and Grube, M. (2013) *Applied Soil Ecology* 68, 20–25.

<sup>35</sup>An, S., Xiao, T., and Yokota, A. (2008) *Journal of General and Applied Microbiology* 54, 253–258.

<sup>36</sup>An, S., Xiao, T., and Yokota, A. (2009) *Journal of Genetic and Applied Microbiology* 55, 339–343.

<sup>37</sup>Davies, J., Wang, H., Taylor, T., Warabi, K., Huang, X.-H., and Andersen, R. J. (2005) *Organic Letters* 7, 5233–5236.

<sup>38</sup>Li, B., Xie, C., and Yokota, A. (2007) *Actinomycetologica* 21, 22–26.

<sup>39</sup>Bjelland, T., Grube, M., Hoem, S., Jorgensen, S. L., Daae, F. L., Thorseth, I. H., and Øvreås, L. (2011) *Environmental Microbiology Reports* 3, 434–442.

Les objectifs de cette étude pluridisciplinaire sont de mettre en évidence que les lichens, en l'occurrence marins/maritimes et terrestres (une espèce étudiée), sont une niche bactérienne nouvelle, elle même nouvelle source pour la recherche de métabolites d'intérêts.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse sont décrits au travers de 6 parties.

La **partie 1** consiste à présenter les lichens de manière synthétique et plus particulièrement leur morphologie, leur écologie, leur composition chimique et leurs propriétés biologiques déjà décrites.

La **partie 2** présente les résultats obtenus au cours de l'étude chimique de 9 lichens. Ces travaux ont concerné la mise au point de conditions d'extraction, des profilages chimiques par diverses méthodes analytiques suivi de l'étude chimique de deux lichens maritimes (*Roccella fuciformis* et *R. phycopsis*) ainsi que l'étude de la localisation *in-situ* de leurs métabolites.

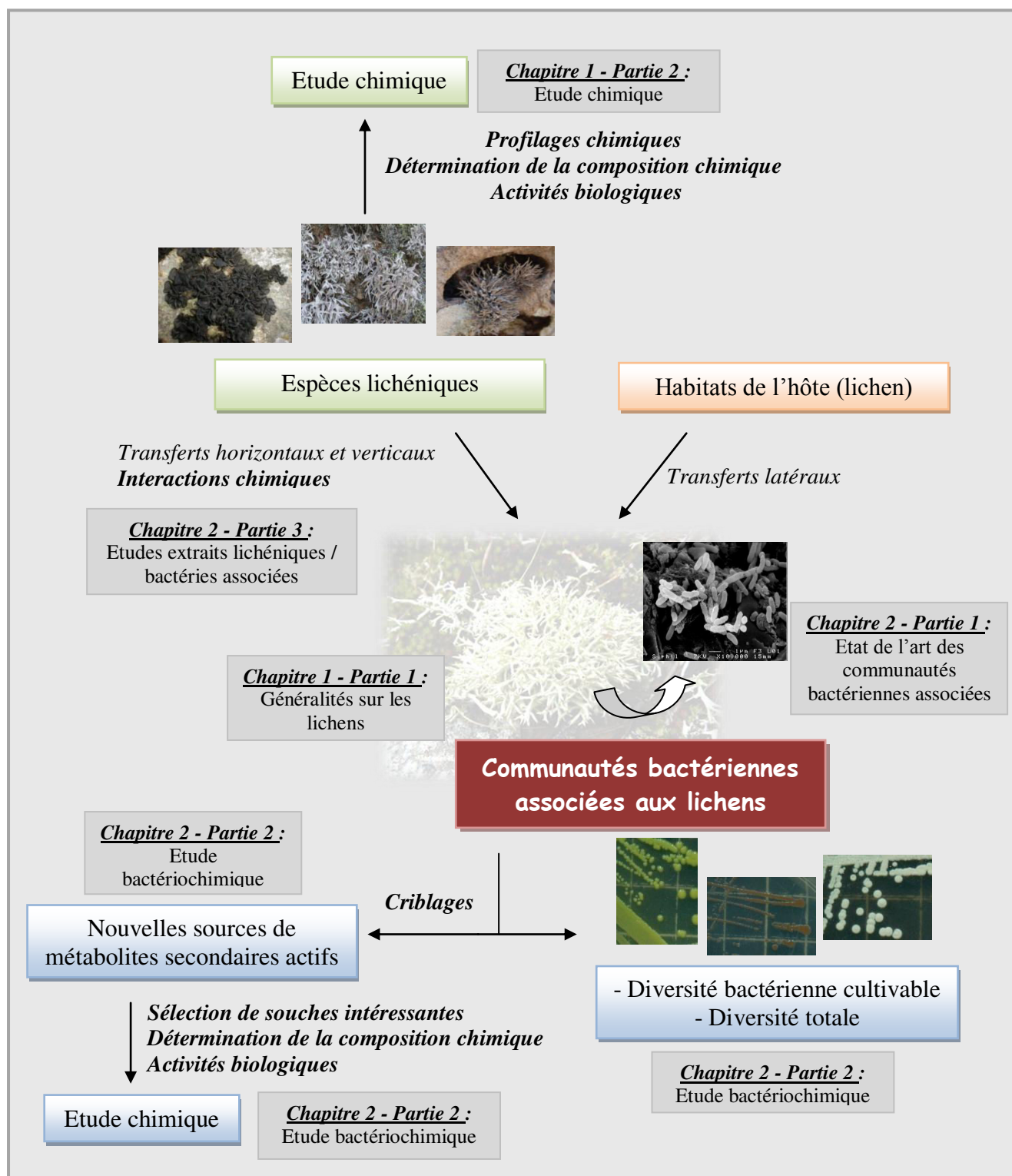
La **partie 3** consiste à faire un état de l'art des données bibliographiques disponibles sur les communautés bactériennes associées aux lichens.

La **partie 4** présente les résultats obtenus concernant l'isolement et l'identification des communautés bactériennes associées à quatre lichens, les criblages biologiques, les études chimiques de deux souches (MOLA1488 : *Streptomyces cyaneofuscatus* et MOLA1416 : *Hoeflea phototrophica*) ainsi qu'un profilage chimique de 10 souches bactériennes associé à une méthode de dérégulation basée sur les similarités de fragmentation en masse des composés.

La **partie 5** présente les résultats obtenus concernant les influences possibles du métabolisme lichéniques sur le métabolisme bactérien.

Enfin, la **partie 6** décrit l'ensemble des différents matériels et méthodes utilisés et/ou développés pour mener les travaux expérimentaux réalisés.

Un schéma général de l'étude est présenté **Figure 1**.



**Figure 1 : Schéma général de l'étude**

## Références bibliographiques (Introduction)

---

- (1) Silver, L. L. (2011) Challenges of antibacterial discovery. *Clinical Microbiology Reviews* 24, 71–109.
- (2) Frieden, T. (2013) Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. *Centers for Disease Control and Prevention*, p 114.
- (3) Fukuda, K. (2014) Antimicrobial resistance Global report on surveillance, World health organization, France, p 256.
- (4) Bérdy, J. (2005) Bioactive microbial metabolites. *Journal of Antibiotics* 58, 1–26.
- (5) Demain, A. L., and Fang, A. (2000) The natural functions of secondary metabolites. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology* 69, 1–39.
- (6) Jose, P. A., Robinson, S., and Jebakumar, D. (2013) Non-streptomycete actinomycetes nourish the current microbial antibiotic drug discovery. *Frontiers in Microbiology* 4, 2008–2010.
- (7) Koehn, F. E., and Carter, G. T. (2005) The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* 4, 206–220.
- (8) Fiedler, H.-P., Bruntner, C., Bull, A. T., Ward, A. C., Goodfellow, M., Potterat, O., Puder, C., and Mihm, G. (2005) Marine actinomycetes as a source of novel secondary metabolites. *Antonie Van Leeuwenhoek* 87, 37–42.
- (9) Bull, A. T., Stach, J. E. M., Ward, A. C., and Goodfellow, M. (2005) Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions. *Antonie Van Leeuwenhoek* 87, 65–79.
- (10) Fu, P., Johnson, M., Chen, H., Posner, B. a, and Macmillan, J. B. (2014) Carpatamides A-C, Cytotoxic Arylamine Derivatives from a Marine-Derived *Streptomyces* sp. *Journal of Natural Products* 77, 1245–1248.
- (11) Goodfellow, M., Stach, J. E. M., Brown, R., Bonda, A. N. V., Jones, A. L., Mexson, J., Fiedler, H.-P., Zucchi, T. D., and Bull, A. T. (2012) *Verrucosipora maris* sp. nov., a novel deep-sea actinomycete isolated from a marine sediment which produces abyssomicins. *Antonie Van Leeuwenhoek* 101, 185–193.
- (12) Oh, D.-C., Williams, P. G., Kauffman, C. a, Jensen, P. R., and Fenical, W. (2006) Cyanosporasides A and B, chloro- and cyano-cyclopenta[a]indene glycosides from the marine actinomycete “*Salinispora pacifica*”. *Organic Letters* 8, 1021–1024.
- (13) Antony-Babu, S., Stach, J. E. M., and Goodfellow, M. (2008) Genetic and phenotypic evidence for *Streptomyces griseus* ecovars isolated from a beach and dune sand system. *Antonie Van Leeuwenhoek* 94, 63–74.
- (14) Watson, E. T., and Williams, S. T. (1974) Studies on the ecology of actinomycetes in soil - VII. Actinomycetes in a coastal sand belt. *Soil Biology Biochemistry* 6, 43–52.
- (15) Hong, K., Gao, A.-H., Xie, Q.-Y., Gao, H., Zhuang, L., Lin, H.-P., Yu, H.-P., Li, J., Yao, X.-S., Goodfellow, M., and Ruan, J.-S. (2009) Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China. *Marine Drugs* 7, 24–44.



- (16) Lawrey, J. D., and Diederich, P. (2003) Lichenicolous Fungi: Interactions, Evolution, and Biodiversity. *The Bryologist* 106, 80–120.
- (17) Muggia, L., Gueidan, C., Knudsen, K., Perlmutter, G., and Grube, M. (2013) The lichen connections of black fungi. *Mycopathologia* 175, 523–535.
- (18) Honegger, R. (2012) The Symbiotic Phenotype of Lichen-Forming Ascomycetes and Their Endo- and Epibionts, in *The mycota IX*, pp 287–339.
- (19) Hoffman, M. T., and Arnold, A. E. (2010) Diverse bacteria inhabit living hyphae of phylogenetically diverse fungal endophytes. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 4063–4075.
- (20) Molnár, K., and Farkas, E. (2010) Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review. *Zeitschrift für Naturforschung C* 65, 157–173.
- (21) Ingolfssdottir, K. (2002) Usnic acid. *Phytochemistry* 61, 729–736.
- (22) Lauterwein, M., Oethinger, M., Belsner, K., Peters, T., and Marre, R. (1995) In Vitro Activities of the Lichen Secondary Metabolites Vulpinic Acid , (+)-Usnic Acid , and (-)-Usnic Acid against Aerobic and Anaerobic Microorganisms. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 39, 2541–2543.
- (23) Shukla, V., Joshi, G. P., and Rawat, M. S. M. (2010) Lichens as a potential natural source of bioactive compounds: a review. *Phytochemistry Reviews* 9, 303–314.
- (24) Shrestha, G., and St. Clair, L. L. (2013) Lichens: a promising source of antibiotic and anticancer drugs. *Phytochemistry Reviews* 12, 229–244.
- (25) Bates, S. T., Cropsey, G. W. G., Caporaso, J. G., Knight, R., and Fierer, N. (2011) Bacterial communities associated with the lichen symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 1309–1314.
- (26) Cardinale, M., Berg, G., Grube, M., Vieira de Castro, J., and Müller, H. (2008) In situ analysis of the bacterial community associated with the reindeer lichen *Cladonia arbuscula* reveals predominance of *Alphaproteobacteria*. *FEMS Microbiology Ecology* 66, 63–71.
- (27) González, I., Ayuso-Sacido, A., Anderson, A., and Genilloud, O. (2005) Actinomycetes isolated from lichens: evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. *FEMS Microbiology Ecology* 54, 401–415.
- (28) Cardinale, M., Grube, M., Castro, J. V., Müller, H., and Berg, G. (2012) Bacterial taxa associated with the lung lichen *Lobaria pulmonaria* are differentially shaped by geography and habitat. *FEMS Microbiology Letters* 329, 111–115.
- (29) Cardinale, M., Puglia, A. M., and Grube, M. (2006) Molecular analysis of lichen-associated bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology* 57, 484–495.
- (30) Grube, M., and Berg, G. (2009) Microbial consortia of bacteria and fungi with focus on the lichen symbiosis. *Fungal Biology Reviews* 23, 72–85.
- (31) Grube, M., Cardinale, M., De Castro, J. ., Mu, H., and Berg, G. (2009) Species-specific structural and functional diversity of bacterial communities in lichen symbioses. ISME *International Society. in Microbial Ecology* 3, 1105–1115.

- (32) Hodkinson, B. P., and Lutzoni, F. (2010) A microbiotic survey of lichen-associated bacteria reveals a new lineage from the Rhizobiales. *Symbiosis* 49, 163–180.
- (33) Liba, C. M., Ferrara, F. I. S., Manfio, G. P., Fantinatti-Garboggini, F., Albuquerque, R. C., Pavan, C., Ramos, P. L., Moreira-Filho, C. a, and Barbosa, H. R. (2006) Nitrogen-fixing chemo-organotrophic bacteria isolated from cyanobacteria-deprived lichens and their ability to solubilize phosphate and to release amino acids and phytohormones. *Journal of Applied Microbiology* 101, 1076–1086.
- (34) Muggia, L., Klug, B., Berg, G., and Grube, M. (2013) Localization of bacteria in lichens from Alpine soil crusts by fluorescence in situ hybridization. *Applied Soil Ecology* 68, 20–25.
- (35) An, S., Xiao, T., and Yokota, A. (2008) *Schumannella luteola* gen . nov ., sp . nov ., a novel genus of the family *Microbacteriaceae*. *Journal of General and Applied Microbiology* 54, 253–258.
- (36) An, S., Xiao, T., and Yokota, A. (2009) *Leifsonia lichenia* sp . nov ., isolated from lichen in Japan. *Journal of General and Applied Microbiology* 55, 339–343.
- (37) Davies, J., Wang, H., Taylor, T., Warabi, K., Huang, X.-H., and Andersen, R. J. (2005) Uncialamycin, A New Eneidyne Antibiotic. *Organic Letters* 7, 5233–5236.
- (38) Li, B., Xie, C., and Yokota, A. (2007) *Nocardioides exalbidus* sp. nov., a novel actinomycete isolated from lichen in Izu-Oshima Island , Japan. *Actinomycetologica* 21, 22–26.
- (39) Bjelland, T., Grube, M., Hoem, S., Jorgensen, S. L., Daae, F. L., Thorseth, I. H., and Øvreås, L. (2011) Microbial metacommunities in the lichen-rock habitat. *Environmental Microbiology Reports* 3, 434–442.



# *Chapitre 1 - Les lichens : Des micro-écosystèmes à eux seuls.*

---



## *PARTIE 1 - Généralités sur les lichens*

---



Les lichens seront présentés dans cette première partie suivant leurs caractères morphologiques et anatomiques, leur écologie et leur composition chimique : métabolites primaires et spécifiques ainsi que leurs activités biologiques décrites. Dans un deuxième temps, les espèces considérées au cours de cette étude seront présentées plus en détail.

## 1. Les lichens

### 1.1. Définitions

Les lichens sont des organismes appartenant au groupe des cryptogames au même titre que les champignons, les mousses et les fougères. Les premiers lichens seraient apparus il y a 400 millions d'années et entre 17000 et 20000 espèces auraient été dénombrées, ce qui représente environ 40% d'espèces fongiques lichénilisées.<sup>18,40</sup> Ils sont caractérisés par l'association symbiotique entre une algue et/ou une cyanobactérie appelée **photosymbionte** ou **photobionte** et un champignon appelé **mycosymbionte** ou **mycobionte**.<sup>41</sup>

Le **photobionte** appartient pour 85% des cas à la classe des *Chlorophyceae* (algues vertes) regroupant la famille des *Chlorococcaceae* qui est représentée pour plus de 60% par l'ordre des *Trebouxiales* avec le genre *Trebouxia* sp. (20%) et l'ordre des *Trentepohliales* avec le genre *Trentepohlia* sp. 10% des espèces lichéniques possèdent un photobionte appartenant à la classe des *Cyanophyceae* (Cyanobactéries) représentées par 4 familles : *Chroococcales* (*Gloeocapsa* sp.), *Nostocales* (*Nostoc* sp., *Scytonema* sp.), *Pleurocapsales* et *Stigonematales*. Parmi ces quatre familles, la plus communément retrouvée est la famille des *Nostocales* représentée par le genre *Nostoc* sp. 3% des lichens possèdent à la fois un photobionte appartenant aux Chlorophycées et aux Cyanophycées. Dans ce dernier cas, les espèces lichéniques contiennent aussi bien des algues vertes que des cyanobactéries comme photobiontes. Plusieurs espèces d'un même genre d'algues peuvent servir de photobiontes à une même espèce de lichen. De manière générale, plus de 120 espèces de cyanobactéries et d'algues vertes sont connues à ce jour.<sup>18</sup> A l'exception du genre *Trebouxia*, les genres *Nostoc*, *Scytonema*, *Gloeocapsa* et *Trentepohlia* peuvent aussi bien être trouvés au sein de l'association « lichen » que seuls à l'état libre. Dans ce dernier cas, les espèces à l'état libre et lichénilisées sont retrouvées dans les mêmes habitats.<sup>42</sup>

L'autre partenaire symbiotique en l'occurrence le **mycobionte**, qui représente entre 50 et 90% de la biomasse du thalle lichénique, appartient à 99% aux Ascomycètes et plus particulièrement au subphylum des *Pezizomycotina* et seulement 1% aux Basidiomycètes.<sup>43,18</sup> Ainsi, environ 40%, soit plus de 18000 espèces fongiques sont lichénilisées.

<sup>40</sup>Boustie, J., Grube, M. (2005) *Plant Genetic Resources* 3, 273–328.

<sup>41</sup>Dobson, F. (2005) *Lichens : An illustrated guide to the British and Irish species*; Shoulg, Royaume-Uni, p. 480.

<sup>42</sup>Nash, T. H. (2008) *Lichen Biology*; Cambridge, Royaume-uni, p. 498.

<sup>43</sup>Ozenda, P., Clauzade, G. (1970) *Les lichens : étude biologique et flore illustrée*; Masson, Paris, p. 801.



Au sein des Ascomycètes, 3 classes sont principalement représentées : la classe des (1) *Lecanoromycètes* avec 14200 espèces, (2) celle des *Arthoniomycètes* avec 1500 espèces et enfin la classe des (3) *Lichinomycètes* avec 350 espèces.<sup>18</sup> De même, une espèce fongique peut former des lichens avec des algues ou des cyanobactéries différentes, comme c'est le cas de *Sticta canariensis*.<sup>44</sup>

De cette association symbiotique en résulte la formation d'un **corps lichénique** ou **thalle** distinct, ne ressemblant à aucun des deux partenaires vivant à l'état libre.<sup>45</sup> Outre ces deux partenaires symbiotiques (photobionte et mycobionte) classiquement décrits, un troisième partenaire peut y être également intégré : les champignons épi et/ou endophytiques<sup>42,46</sup> ainsi que le **bactériobionte** ou **communautés bactériennes associées**.<sup>47</sup> Ce dernier partenaire sera décrit plus particulièrement et précisément dans le Chapitre 2 - Les lichens : une nouvelle niche bactérienne ?

### 1.2. Diversité et écologie des lichens

Les lichens présentent une large gamme de couleur passant du orange, jaune, rouge, vert, gris, marron et au noir. La taille des thalles lichéniques varient de moins de quelques millimètres de long à des thalles pouvant atteindre 2 mètres (cas d'*Usnea* sp.). La plupart des lichens sont des organismes pérennes, à l'exception de quelqu'un qui sont éphémères (*Vezdaea* sp.). D'autre part, beaucoup de lichens sont capables de survivre plus de 1000 ans et leur croissance est quasi imperceptible. Cette dernière est de l'ordre de quelques millimètres par an<sup>42</sup> et peut également être considérée comme importante lorsque la croissance est de l'ordre de 1 cm/an.<sup>23</sup> Par conséquent, les lichens sont des organismes à croissance très lente.

Deux grands types de lichens peuvent être rencontrés : les lichens dits **épiphytiques** et **épilithiques**. Les lichens **épiphytes** sont fréquemment retrouvés sur les arbres et sur d'autres plantes et également dans certains écosystèmes dont leur biomasse peut dépasser plusieurs centaines de Kg/ha.<sup>48</sup> Ces lichens colonisent fréquemment les sols nus où ils constituent une couche importante du sol pour les paysages arides et semi-arides.<sup>49-52</sup> Les lichens **épilithiques** se développent à la surface des roches où ils sont incorporés de quelques millimètres dans la couche supérieure rocheuse.

De manière générale, la plupart des lichens sont terrestres et colonisent la plupart des écosystèmes terrestres du monde, mais un petit nombre parmi eux se développent (1) dans des ruisseaux d'eau douce (e.g. *Peltigera hydrothyria*), et (2) au niveau de la zone intertidale marine

<sup>44</sup>Raven, P. H., Evert, R. F., and Eichhorn, E. (2000) Biologie végétale, De Boeck, Royaume-Uni, p 733.

<sup>45</sup>Purvis, W. (2000) Lichens, London, p. 112.

<sup>46</sup>Stocker-Wörgötter, E. (2008) *Natural Products Reports* 25, 188–200.

<sup>47</sup>De Castro, J. J. V., Mu, H., Berg, G., Grube, M., Cardinale, M., Müller, H. (2009) *International Society for Microbial Ecology*, 3, 1105–1115.

<sup>48</sup>Coxson, D. S., Nadkarni, N. M. (1995) In *Ecological Roles of Epiphytes in Nutrient Cycles* 20, 495–543.

<sup>49</sup>Barger, N. N., Herrick, J. E., Zee, J., Belnap, J. (2006) *Biogeochemistry* 77, 247–263.

<sup>50</sup>Lalley, J. S., Viles, H. A. (2007) *Biodiversity and Conservation* 17, 1–20.

<sup>51</sup>Evans, R. D., Lange, O. L. (2003) In *Biological Soil Crusts: Structure, Function, and Management*; pp. 263–279.

<sup>52</sup>Evans, R. D., Johansen, J. R. (1999) *Plant Science* 18, 183–225.

(*Lichina* sp. et *Verrucaria maura*). Dans les écosystèmes polaires et subpolaires, les lichens constituent la dominante autotrophe.<sup>53</sup>

Ces derniers sont également des éléments remarquables des écosystèmes alpins, côtiers et forestiers (les forêts pluviales tempérées de l'hémisphère sud et de la taïga de l'hémisphère nord). Les espèces lichéniques à croissance plus rapide peuvent contribuer de manière plus significative à la productivité primaire et augmenter la biomasse de 20 à 40% en 1 an et jouer un rôle important dans les processus écologiques (cycle de l'azote, re-minéralisation) de leur écosystème. En particulier, les cyanolichens peuvent intervenir dans le métabolisme azoté.<sup>42</sup>

De part leur capacité de coloniser des écosystèmes variés : marins, terrestres (arides à tempérés) et même arctiques, les lichens ont mis en place des mécanismes adaptatifs (production d'osmoprotectants par exemple) afin de faire face à différentes contraintes environnementales : stress salins, sécheresse, stress hydriques ...<sup>54</sup>

### 1.3. Morphologies et anatomie des lichens : thalles, organes & structures

A la différence des plantes supérieures, les lichens ne possèdent ni racine, ni tige, ni feuille, mais un appareil végétatif rudimentaire : **le thalle**. Ce dernier, ainsi que les différents organes dont il est porteur, présente une grande diversité de formes et de couleurs. En revanche, on constate moins de variations en ce qui concerne leurs structures anatomiques.

#### 1.3.1. Différents types de thalles lichéniques

La morphologie des lichens est sous la forte dépendance des contraintes environnementales.<sup>42</sup> On distingue généralement 7 types de thalles.<sup>55,42</sup> La distinction de ces principaux types permet par l'observation à l'œil nu ou à la loupe de rentrer dans les premiers critères des clés de détermination, sachant qu'il existe de nombreuses formes intermédiaires. On observe de manière générale (**Tableau 1**) :

- **Les thalles gélatineux** : noirs et cassants à l'état sec, ils sont gélatineux, pulpeux à l'état humide.
- **Les thalles foliacés** : l'appareil végétatif présente une forme de lame ou de feuille plus ou moins lobée, et se détache généralement facilement du substrat. Le thalle est fixé au substrat soit par des rhizines soit par des crampons.









<sup>53</sup>Longton, R. E. (1988) *The biology of polar bryophytes and lichens*; Cambridge, New York, p. 391.

<sup>54</sup>Delmail, D., Grube, M., Parrot, D., Cook-moreau, J., Boustie, J., Labrousse, P., Tomasi, S. (2013) *Ecophysiology and Responses of Plants under Salt Stress*, Springer, New York, 115–148.

<sup>55</sup> Van Haluwyn, C., Asta, J. (2009) *Guide des lichens de France : Lichens des arbres*; Belin, Paris, p. 231.

- **Les thalles fruticuleux** : la surface de contact avec le substrat est très réduite. Les thalles sont plus ou moins ramifiés, dressés ou pendants.
- **Les thalles crustacés** : le thalle pénètre parfois si profondément dans le substrat (terre, écorce ou roche) qu'on ne peut le détacher sans prélever le substrat lui-même (90% des lichens sont crustacés).
- **Les thalles squamuleux** : ces thalles se présentent sous forme de petites écailles qui peuvent se chevaucher partiellement.
- **Les thalles lépreux** : à l'œil nu, ces thalles ressemblent à de la poudre qui se détachent facilement du substrat.
- **Les thalles composites** : formés d'un thalle primaire plus ou moins foliacé ou squamuleux, adhérent au substrat, sur lequel se développe un thalle secondaire dressé, plus ou moins ramifié, ou en forme de trompette.

**Tableau 1 : Représentation des différents types de thalles lichéniques**

Thalles gélatineux	Thalles foliacés		Thalles fruticuleux
 <i>Collema undulatum</i> <sup>a</sup> Laurer ex Flot.	<i>Fixation par rhizines</i>  <i>Xanthoria elegans</i> <sup>a</sup> (Link) Th. Fr	<i>Fixation par crampons</i>  <i>Umbilicaria cylindrica</i> <sup>a</sup> (L.) Del.	 <i>Ramalina cuspidata</i> <sup>a</sup> (Ach.) Nyl.
Thalles crustacés	Thalles squamuleux	Thalles lépreux	Thalles composites
 <i>Pertusaria albescens</i> <sup>a</sup> (Huds.) Choisy & Werner	 <i>Normandina pulchella</i> (Borrer) Nyl. <sup>b</sup>	 <i>Lepraria neglecta</i> <sup>a</sup> (Nyl.) Lettau	 <i>Cladonia floekeana</i> <sup>a</sup> (F.) Flörke

<sup>a</sup> Photographies issues de l'association française de lichénologie : <http://www2.ac-lille.fr>

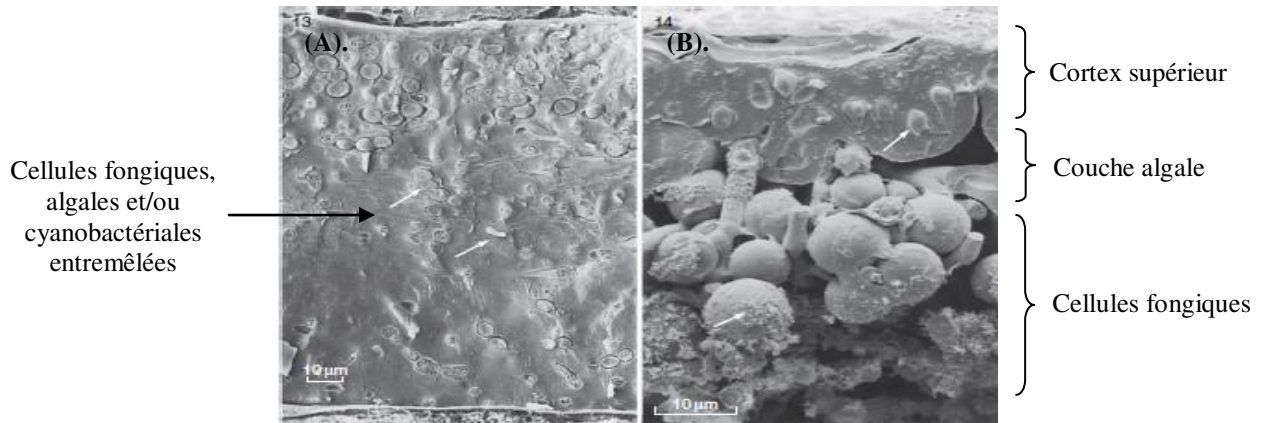
<sup>b</sup> Photographie issue de Irish Lichens : <http://www.irishlichens.ie>

### 1.3.2. Structures anatomiques

Contrairement à leur morphologie qui peut être variée, la structure des lichens est relativement homogène et assure leur unité. On en distingue tout de même deux types<sup>42</sup> (**Figure 2**) :

- **Structure de type homéomère** : champignons et algues ou cyanobactéries sont entremêlés de façon homogène.

- **Structure de type hétéroème** : on observe une disposition par couches. La structure est donc stratifiée et on observe de la face supérieure à la face inférieure :
  - Un cortex supérieur formé par des cellules jointives de champignons
  - Une couche algale, mélange d'algues et de champignons lichéniques telles que pour *Cladonia rangiferina*.



**Figure 2** : Photographies au microscope électronique à transmission (TEM) de structure homéomère (A). et de structure hétéroème (B).<sup>42</sup>

## 1.4. Morphogénèse & Interactions symbiotiques

### 1.4.1. Organes

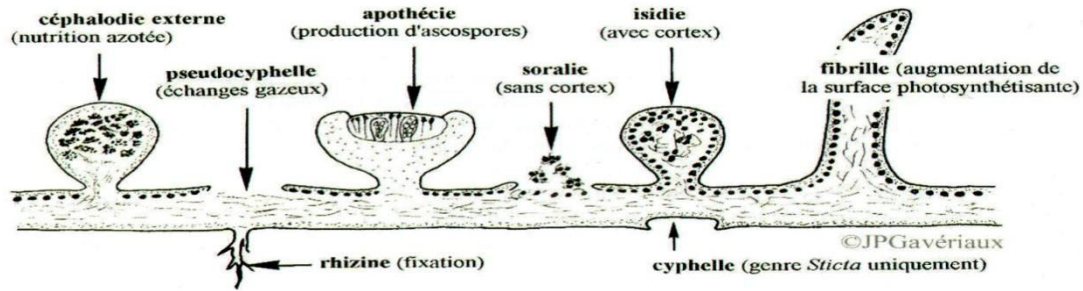
#### 1.4.1.1. Organes non reproducteurs

Le thalle peut également porter un certain nombre d'organes divers. D'un côté, on peut être en présence d'organes de nature fongique, protégeant contre les radiations, limitant l'évapotranspiration mais n'ayant aucune fonction assimilatrice : poils et cils. D'un autre côté, on retrouve des organes comme des (1) fibrilles augmentant la surface photosynthétisante, (2) spinules, (3) haptères, (4) rhizines facilitant l'adhésion au substrat, (5) papilles, (6) tubercules, (7) céphalodies, (8) cyphelles, (9) nodules, (10) veines et (11) pseudocyphelles ayant un rôle important dans les échanges gazeux avec l'atmosphère (**Figure 3**).<sup>42, 56</sup>

#### 1.4.1.2. Organes reproducteurs

Des structures plus organisées peuvent également se former. Elles contiennent toujours l'algue et le champignon. C'est le cas des schizidies, des phylidies, des soralies, des isidies assurant la reproduction végétative et des apothécies (deux sous morphologies : lecanorine (présence de cellules algales) et lécideine (absence de cellules algales) assurant la reproduction sexuée (**Figure 3 et 4**).<sup>42, 56</sup>

<sup>56</sup>Biéro, T., Laroubine, C., Lottin, N., Vaudoré, D. (2008) *Val d'Orne Environnement Société Linnéenne de Normandie Parc Naturel régional Normandie Maine*, p. 94.



**Figure 3 : Représentations schématiques de certains organes reproducteurs et non reproducteurs**<sup>56</sup>

### 1.4.2. Reproduction & cycle de développement

Deux cas de reproduction sont retrouvés chez les lichens : une reproduction végétative et une reproduction sexuée. Pour cette dernière et comme c'est le cas chez les champignons, la majorité des ascomycètes lichénisés ont un cycle de vie présentant une phase sexuée et une phase asexuée. Chez les lichens, le mycobionte assure la reproduction sexuée et aussi la reproduction asexuée. Le mode de reproduction du photobionte est réduit à l'étape de lichénisation qui est dépendante de la rencontre des spores (fongiques) avec les partenaires photosynthétiques appropriés pour pouvoir rétablir la symbiose. En plus des organes sexués (**téléomorphes**) et asexués (**anamorphes**), les ascomycètes lichénisés sont impliqués dans de nombreuses propagules végétatives par lesquels les deux partenaires (photobiontes et mycobiontes) sont disséminés.<sup>42</sup>

#### 1.4.2.1. Reproduction végétative : dissémination du thalle lichénique

Les lichens sont des organismes reviviscents, capables de subsister longtemps devenant cassant à l'état sec. Leurs fragments dispersés par le vent ou les animaux peuvent engendrer de nouveaux individus. De plus, des organes comme des soralies et des isidies peuvent également contribuer à ce mode de reproduction. En effet, les soralies par déchirures du thalle vont être à l'origine d'émission des sorédies, formées d'un enchevêtrement d'algues et d'hyphes. Ces sorédies forment la soralie dont la couleur est généralement différente de celle du thalle. Légères, elles sont facilement transportées par le vent, la pluie, les insectes et permettent une dissémination de l'espèce. D'un autre côté, les isidies à sa surface du thalle sous forme de petits bourgeons (sphériques, cylindriques, ramifiés...) contenant les algues et les hyphes. Ces isidies, plus lourdes que les soralies, ne peuvent être transportées aussi loin, elles assurent plutôt une colonisation du substrat (**Figure 4**).<sup>42,57</sup>

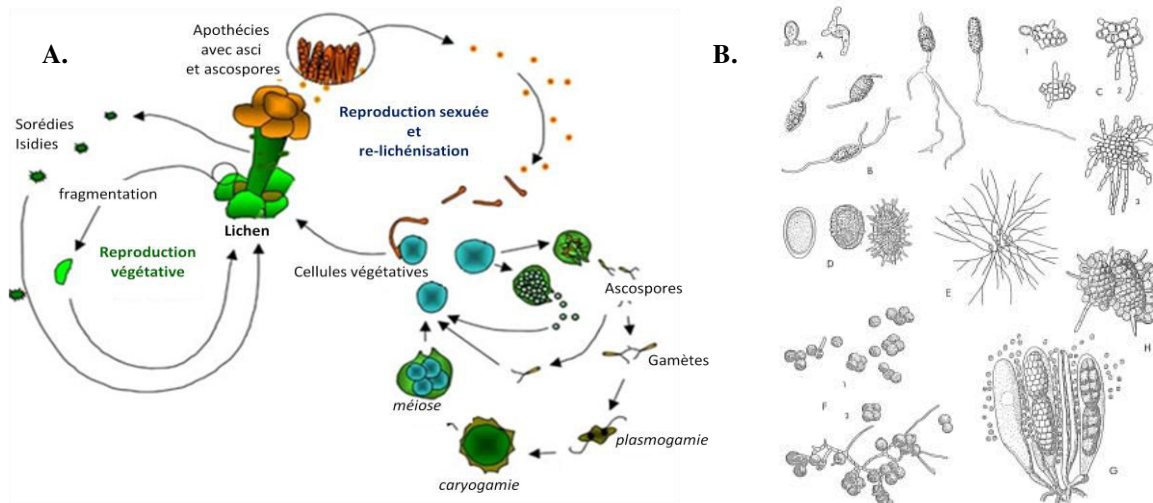


### 1.4.2.2. Reproduction sexuée : production de spores par le mycobionte

Lors de la reproduction sexuée, deux hyphes fongiques sexuellement différenciées fusionnent et donnent, à la surface du thalle, des structures en forme (1) de boutons : les apothécies, ou (2) de coupes plus ou moins fermées : les périthèces, dans lesquelles des cellules particulières (les asques) vont élaborer les ascospores (en général 8 spores par asque mais le nombre peut varier, et des mitoses post-méiotiques permettent d'obtenir dans certains cas 32, 64... ascospores, ou beaucoup moins si certaines cellules méiotiques avortent).

Entre les asques se trouvent des cellules stériles : les paraphyses, dont les extrémités renflées peuvent contenir des pigments responsables de la couleur de l'hyménium.

Après leur libération, ces spores issues d'une reproduction sexuée, germent et donnent des hyphes qui capturent des algues pour pouvoir redonner un nouveau thalle lichénique (**Figure 4A et B**).<sup>42,57</sup>



**Figure 4 : A. Cycle théorique de reproduction des lichens : phase végétative et sexuée** (<http://home.cc.umanitoba.ca/~pierceyn/lifecycle.html>) et B. Germination des spores lichéniques (spores uni ou bicellulaires : A à C ; spores géantes : D ; jeune mycélium : E ; Gonidies : F ; Fragments d'hyménium : G et Germination de deux spores : H)<sup>43</sup>

### 1.4.3. Interactions symbiotiques : mycobiontes et photobiontes

Au sein de la symbiose, les différents partenaires la constituant contribuent chacun à leur manière au développement et à la croissance du lichen. La protection offerte par le mycobionte permet au photobionte de maintenir une photosynthèse active dans des conditions drastiques de stress abiotique et donc de maintenir en vie l'organisme tout entier. Lorsque les conditions ne permettent plus au lichen de maintenir son métabolisme (teneur en eau inférieure à 30%), celui-ci passe dans un état de vie ralentie. Selon les lichens cet état peut durer de quelques jours à plusieurs années. Une

<sup>57</sup>Sérusiaux, E., Diederich, P., Lambinon, J. (2004) *Les macrolichens de Belgique, du Luxembourg et du nord de la France - Clés de détermination*; Ferrantia.; Luxembourg, p. 192.

simple ré-humidification suffit alors à réactiver rapidement le métabolisme, c'est le phénomène de **reviviscence**.<sup>45,55</sup>

La base de l'association repose sur l'apport d'hydrates de carbone par un organisme autotrophe pour le carbone : **le photobionte**, à un organisme hétérotrophe pour cet élément : **le mycobionte**. Dans le cas des algues vertes ces hydrates de carbone sont fournis au champignon sous forme de polyols tandis que les cyanobactéries fixent le CO<sub>2</sub> sous forme de glucose. En plus de cet apport indispensable, les algues fournissent le champignon en vitamines nécessaires à leur croissance ainsi qu'en ammonium dans le cas des cyanobactéries (capables de réduire le diazote atmosphérique). Ainsi, le photobionte permet (1) d'assurer l'activité photosynthétique seule (cas des Chlorophycées) ou (2) d'assurer l'activité photosynthétique mais également la fixation de l'azote atmosphérique (cas des Cyanophycées).<sup>55</sup>

De l'autre côté, **le mycobionte** contribue à la croissance du photobionte qu'il abrite. Ainsi, le rôle du mycobionte ne se limite pas à la protection et la fixation, il assure lui aussi un rôle nutritif vis-à-vis du photobionte en lui fournissant eau et sels minéraux puisés sur le substrat et en synthétisant des vitamines (notamment la vitamine C) nécessaires au développement de son photobionte. Cette coopération permet notamment la synthèse de métabolites spécifiques originaux (**substances lichéniques**) que le mycobionte seul serait dans la plupart des cas incapable de produire.<sup>55</sup>

Des éléments structuraux et fonctionnels à l'interface mycobionte-photobionte : **les haustoria et/ou les appressoria** sont également présents (**Figure 5**). Ces structures particulières sont dépendantes de la taxonomie du photobionte et du mycobionte. En effet, tous les photobiontes n'ont pas la capacité de mettre en place de telles structures. Cette capacité est dépendante de la composition chimique de la paroi algale. Si cette dernière est constituée de biopolymères non dégradables enzymatiquement (comme des like-sporopollenin composés) comme chez les *Coccomyxa* et les *Elliptochloris*, la formation d'haustorium est impossible.

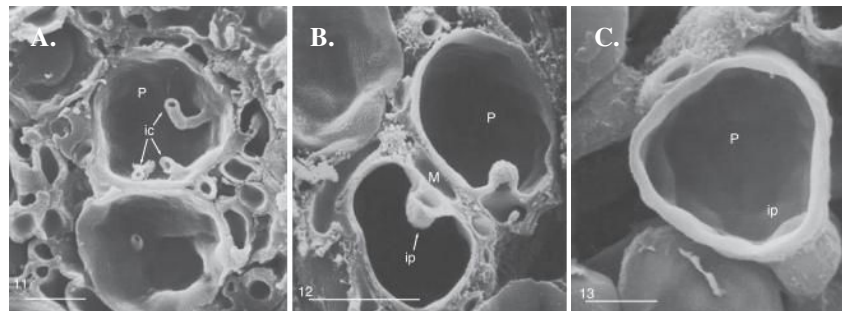
Dans les cas contraire, où toutes les conditions sont favorables, différents types d'haustorium peuvent être observés selon la nature du thalle lichénique :

- **Haustorium intracellulaire** (lichens crustacés simples) : les hyphes transpercent la paroi algale avec des saillies sous la forme de doigts au niveau d'une invagination de la membrane plasmique du photobionte (A).

- **Haustorium intermédiaire** : les interactions se produisent lorsque le mycobionte forme une courte et globuleuse saillie enveloppée dans la paroi algale localement élargie. Par la suite, le complexe haustorial se développe de manière coordonnée et sur toute la surface jusqu'à maturité scellant ainsi une continuité hydrophobe entre les deux partenaires (B). L'hydrophobie est augmentée également par la formation de métabolites spécifiques cristallisant à la surface.

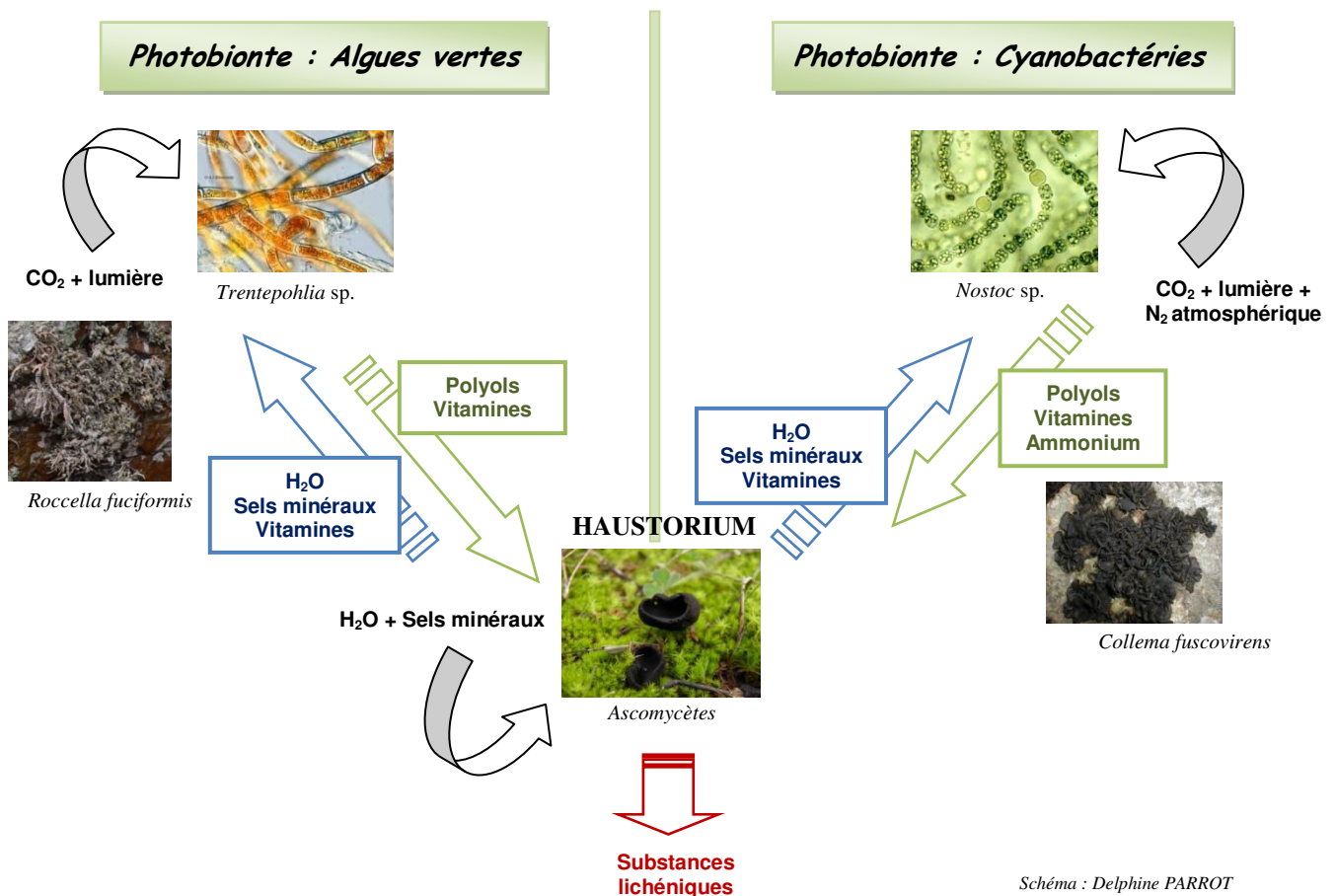
- **Haustorium intrapariétal** (lichens foliacés et/ou fruticuleux) : les hyphes entrent mais ne pénètrent pas la paroi cellulosique du photobionte (C).<sup>42</sup>

Ainsi, l'eau, les nutriments solubles et les métabolites solubles algaux et fongiques sont passivement trans-localisés par une force motrice principale (cycle séchage/mouillage du lichen) sous ce continuum hydrophobe apoplastique.<sup>42</sup>



**Figure 5** : Photographies des différents haustoria (A. haustorium intracellulaire, B. haustorium intermédiaire et C. haustorium intrapariétal) observés au microscope électronique à balayage (Échelle : 5  $\mu$ m, m : mycobionte, p : photobionte et ip : haustorium).<sup>42</sup>

Différents échanges existent entre les différents partenaires symbiotiques (photobiontes et mycobiontes) et peuvent être résumés comme ci-dessous (**Figure 6**). Cependant, des échanges supplémentaires avec les communautés bactériennes associées seront détaillés et pris en considération par la suite (Chapitre 2 - partie 1 - Les lichens : une nouvelle niche bactérienne ?).



**Figure 6** : Illustration schématique des échanges au sein de la symbiose lichénique : photobionte et mycobionte



## 1.5. Composition chimique des lichens : métabolites primaires et spécialisés

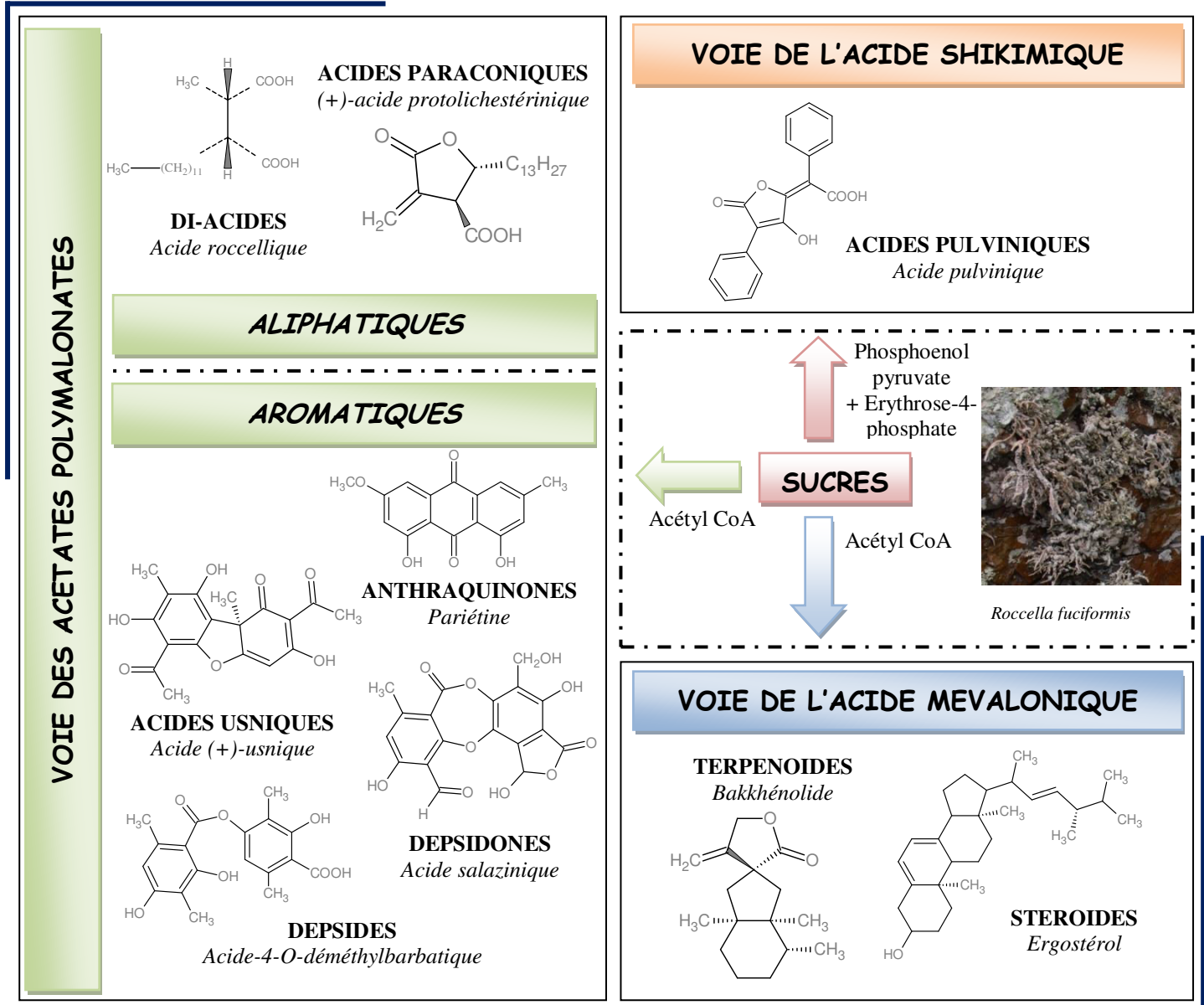
### 1.5.1. Voies de biosynthèse & principales classes de métabolites

Il existe deux grands groupes de métabolites : les métabolites primaires (indispensables au développement et à la reproduction de l'organisme) et les métabolites spécialisés (non essentiels à la croissance mais ayant un rôle dans la fonction écologique). Ces composés, en particulier les métabolites spécialisés résultent de différentes voies de biogenèse et présentent des structures spécifiques par rapport à celles observées chez les champignons ou chez les plantes. Trois voies de biosynthèse sont présentes : (1) la voie de l'acide shikimique (assez peu représentée), (2) la voie des acides mévaloniques avec des composés appartenant à la famille des terpènes ou des stéroïdes et (3) la voie des acétates polyacétates (grande majorité et diversité des métabolites spécialisés lichéniques) représentée par des composés appartenant à la famille des depsidones, des depsides, des depsones, des dibenzofuranes, des acides usniques, des quinones/anthraquinones et à la famille des xanthones (**Figure 7**).

Ces substances lichéniques (150 décrites dans le livre *Die flechtenstoffe*<sup>58</sup> en 1907) aux structures chimiques diverses (aliphatiques et aromatiques) sont généralement des molécules de faible poids moléculaire. Elles sont plutôt produites par le mycobionte et s'accumulent dans le cortex ou la médulle. A l'heure actuelle, si on compte également les produits issus des cultures cellulaires de lichens, il y aurait environ 1050 métabolites spécialisés décrits chez les lichens<sup>20</sup> et de nombreux autres restent encore à caractériser.

---

<sup>58</sup>Zopf, W. F. (1907) *Die Flechtenstoffe*: In *Chemischer, Botanischer, Pharmakologischer Und Technischer Beziehung*, Germany, p. 468.



**Figure 7 : Voies de biosynthèse des métabolites spécifiques lichéniques illustrées par quelques familles et métabolites spécifiques caractéristiques modifiées et simplifiées<sup>59</sup>**  
(Schéma et Photographie : Delphine PARROT)

### 1.5.2. Activités biologiques des composés lichéniques

Le rôle des métabolites spécialisés lichéniques au sein de la symbiose est encore peu connu. Ils sont suspectés d'aider le thalle lichénique à se protéger dans son environnement, souvent hostile, contre les herbivores, les pathogènes et des facteurs abiotiques tels que l'irradiation UV. Pour cette raison, la plupart des molécules isolées des lichens font souvent preuve de multiples activités biologiques comme l'acide usnique (l'acide (+)-usnique et l'acide (-)-usnique selon les sources lichéniques), présentant à la fois des activités antimicrobiennes, antiprolifératives et aussi connu pour son absorption UV.<sup>20</sup>

<sup>59</sup>Elix, J. A., Stocker-Wörgötter, E. (2008) In *Lichen Biology*, pp. 1116–1145.

Sans entrer dans les détails, différentes activités décrites peuvent être énumérées pour les molécules lichéniques<sup>20,23,24,60-63</sup> :

- Activité anti-herbivore et insecticide
- Activité antibiotique, antivirale, antifongique
- Activité antitumorale, cytotoxique
- Activité antipyrétique, anti-inflammatoire et analgésique
- Activité antioxydante et de photoprotection.

Certains effets néfastes ont également pu être mis en évidence tels que des phénomènes d'allergie à certaines molécules.<sup>64,65</sup> Ce phénomène pose quelques problèmes, notamment dans l'industrie des cosmétiques qui utilise l'extrait d'*Evernia prunastri* dans de nombreuses préparations parfumées. En Juillet 2008, l'IFRA (International Fragrance Association) a recommandé dans son 43<sup>ème</sup> amendement l'utilisation d'extraits de lichens contenant moins de 100 ppm d'atranol et de chloroatranol (directive européenne 2003/15/CE).

## 2. Espèces lichéniques étudiées

Neuf espèces lichéniques (2 à algues vertes et 7 cyanolichens) ont été prises pour mon étude : 2 espèces appartenant au genre *Lichina* (*L. confinis* et *L. pygmaea*), 2 appartenant au genre *Roccella* (*R. fuciformis* et *R. phycopsis*), 3 appartenant au genre *Collema* (*C. auriforme*, *C. fuscovirens* et *C. cristatum*), 1 appartenant au genre *Leptogium* (*L. lichenoides*) et 1 appartenant au genre *Synalissa* (*S. symphorea*). Ces neuf espèces appartiennent au phylum des *Ascomycota* et au subphylum des *Pezizomycotina*. Elles se différencient soit au niveau de la Classe ou soit au niveau du Genre (**Figure 8**). Ces espèces ont été choisies du fait (1) de leur présence de manière abondante sur les côtes bretonnes (*Roccella* sp. et *Lichina* sp.) et (2) de leurs environnements différents : marins (*Lichina* sp.), maritimes (*Roccella* sp.) et terrestres (*Collema* sp., *Leptogium* sp. et *Synalissa* sp.) afin de comparer leurs profils chimiques ainsi que les communautés bactériennes leur étant associées.

<sup>60</sup>Bandaranayake, W. M. (1997) *Natural Products Reports*, 159–172.

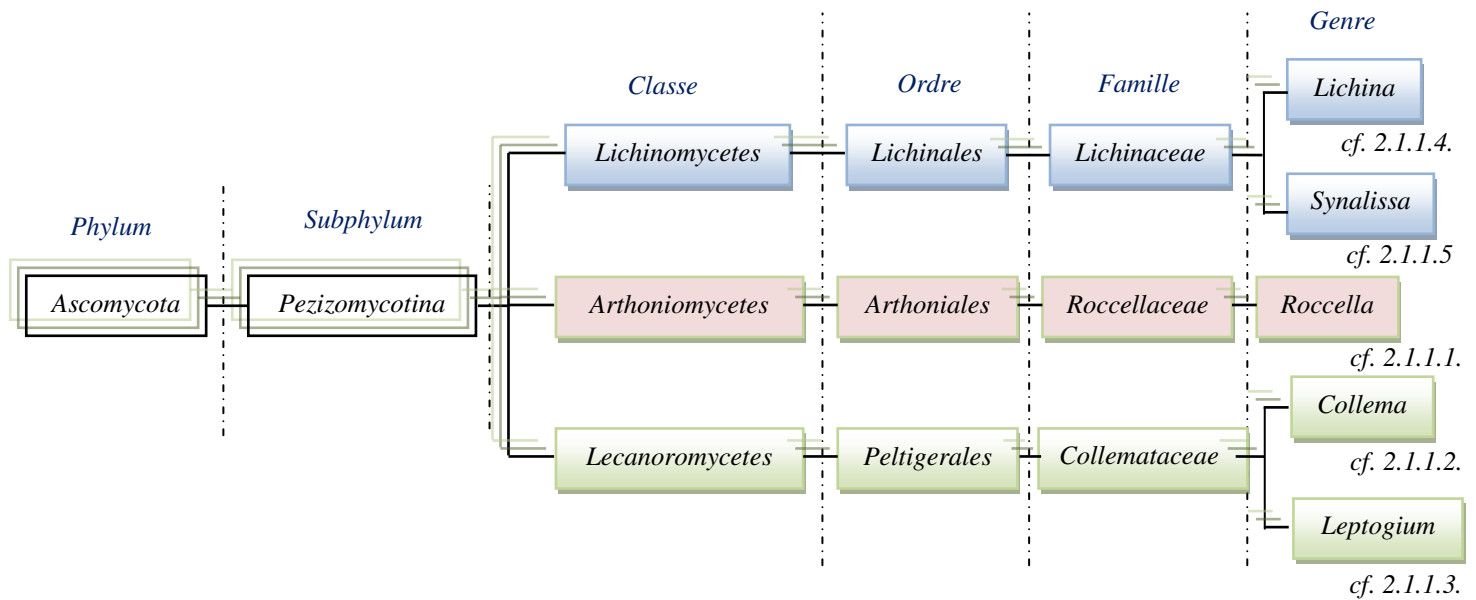
<sup>61</sup>Bačkorová, M., Jendželovský, R., Kello, M., Bačkor, M., Mikeš, J., Fedoročko, P. (2012) *Toxicology In Vitro* 26, 462–468.

<sup>62</sup>Oettl, S. K., Gerstmeier, J., Khan, S. Y., Wiechmann, K., Bauer, J., Atanasov, A. G., Malainer, C., Awad, E. M., Uhrin, P., Heiss, E. H., Waltenberger, B., Remias, D., Breuss, J. M., Boustie, J., Dirsch, V. M., Stuppner, H., Werz, O., Rollinger, J. M. (2013) *PLoS One* 8, 1–10.

<sup>63</sup>Nguyen, K.-H., Chollet-Krugler, M., Gouault, N., and Tomasi, S. (2013) *Natural Products Report* 30, 1490–508.

<sup>64</sup>Nardelli, A., Giménez-Arnau, E., Bernard, G., Lepoittevin, J.-P., Goossens, A. (2009) *Contact Dermatitis* 60, 91–95.

<sup>65</sup>Placzek, M., Frömel, W., Eberlein, B., Gilbertz, K.-P., Przybilla, B. (2007) *Acta Dermato Venereologica* 87, 312–316.



**Figure 8 : Classification des 5 genres lichéniques étudiés (d'après Taxonomy Browser, NCBI)**

## 2.1. Caractéristiques des espèces lichéniques étudiées

### 2.1.1. Caractères morpho-anatomiques

#### 2.1.1.1. Genre *Roccella*

Au sein des 12 genres de *Roccellaceae* connus, le genre *Roccella* est le plus important. Les thalles sont abondamment ramifiés, de couleur grise plus ou moins brunâtre, à ascocarpes noirs, arrondis et plus ou moins immarginés. De plus, les spores sont fusiformes, incolores, munies de plusieurs cloisons transversales. Il comprend une trentaine d'espèces sur la quarantaine d'espèces connues de *Roccellaceae*, parmi lesquelles six sont connues en Europe où elles vivent sur les rochers de toute nature, situées au bord de la mer ou à moins d'une dizaine de kilomètres de celle-ci. Le photobionte caractéristique de ce genre appartient au genre *Trentepohlia* sp (algue verte).<sup>41,66</sup>



Photographie : Delphine PARROT

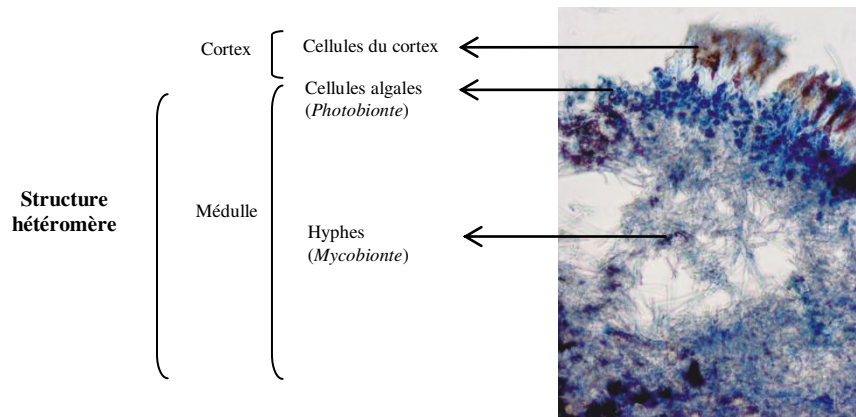
***Roccella fuciformis*** : Lichens de structure hétéromère (**Figure 9**) à thalles sorédiés en général dépourvus d'ascocarpes, fruticuleux, pendant pouvant atteindre jusqu'à 20 cm de longueur, à lanières aplaties jusqu'à 1.5 cm de largeur et de couleur gris-mauve. Les soralies sont blanchâtres, peu saillantes, planes à un peu convexes. De petits lobules sont fréquemment trouvés sur les marges des lanières. La médulle est blanche au niveau du crampon. Au niveau chimique, cette espèce est caractérisée par les réactions thallines suivantes :

- Cortex et médulle C - mais K + (jaune)
- Soralies C + (rouge)

<sup>66</sup> Aptroot, A., Schumm, F. (2011) *Fruticose Roccellaceae - An anatomical-microscopical Atlas and Guide with a worldwide Key and further Notes on some crustose Roccellaceae or similar Lichens*, Booksellers, Germany, p. 375.

- Soralies et médulle UV + (bleu-vert)

L'observation d'apothécies noires est très rare. Elles sont néanmoins marginales ou faciales. Les ascocarpes sont fusiformes, incolores à 3 cloisons, 22-30 x 4-6 µm, paraphyses ± anastomosées.



**Figure 9 :** Coupe transversale de *Roccella fuciformis* colorée au bleu coton et observée au microscope optique (Grossissement x 400) Réalisation : Delphine PARROT

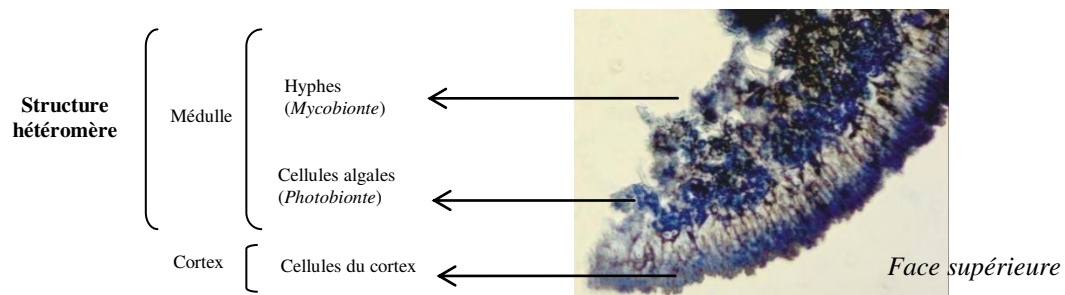


Photographie : Delphine PARROT

***Roccella phycopsis* :** Lichens également de structure hétéromère (**Figure 10**) à thalles sorédiés en général dépourvus d'ascocarpes, fruticuleux, dressés ne dépassant pas généralement 5 cm de longueur, de couleur gris-mauve et à lanières cylindriques (parfois légèrement aplaties). La médulle du crampon est de couleur jaune (critère d'identification). De nombreuses soralies blanchâtres ayant dans un premier temps la forme d'un tubercule puis devenant ± globulaire sont observables. Au niveau chimique, cette espèce est caractérisée par les réactions thallines suivantes :

- Cortex K - mais C + (rouge)
- Médulle et soralies C -
- Soralies et médulle UV + (bleu-vert)

D'autre part, la présence d'apothécies n'est pas observée ou est très rare. Les ascospores sont incolores à 3 cloisons, 18-21 x 4-6 µm de couleur brun pâle avec l'âge.



**Figure 10 :** Coupe transversale de *Roccella phycopsis* colorée au bleu coton et observée au microscope optique (Grossissement x 400) Réalisation : Delphine PARROT

### 2.1.1.2. Genre *Collema*

Au sein de la famille des *Collemataceae*, 300 espèces environ sont répertoriées et regroupées en 8 genres : *Collema* sp. (cf. 2.1.4.), *Homothecium* sp., *Leciophysma* sp., *Leightonella* sp., *Leptogium* sp. (cf. 2.1.5), *Physma* sp., *Ramalodium* sp., *Staurolemma* sp. Le genre *Collema* comprend des espèces à thalles gélatineux, foliacés ou fruticuleux, de couleur sombre (du gris verdâtre au noir) ne présentant pas de cortex et présentant une structure de type homéomère. Ce genre comme les autres genres de la famille des *Collemataceae* sont des cyanolichens ayant comme photobionte le plus souvent une cyanobactérie du genre *Nostoc* sp. Les espèces du genre *Collema* se développent sur une multitude de substrats : écorces, bois, diverses roches, sols, mousses et même sur des débris végétaux.<sup>41,57,67</sup>



*Collema auriforme*<sup>67</sup>

***Collema auriforme*** : Lichens à thalles foliacés pouvant atteindre 3-10 cm dans sa plus grande longueur, formés de lobes sinueux pouvant atteindre 1 cm de largeur, renflés et épais (0,5 mm) si humides, plus ou moins dressés. La surface des thalles est lisse et fortement gonflée si humide, de couleur brun-verdâtre, olivâtre, couverte d'isidies globuleuses (en perles) rassemblées en groupes denses. Les apothécies sont rares, néanmoins, elles sont de 2-3 mm de diamètre et isidiées en marge. Les spores sont ovales, submuriformes, 26-36 x 8-13 µm. Les cyanobactéries constituant le photobionte sont organisées en chainettes dont chaque cellule est de l'ordre de 5-6 µm de diamètre.

Les réactions chimiques sont toutes négatives. Cette espèce peut être trouvée aussi sur des rochers calcaires ombragés plus ou moins couverts de mousses, parfois également à la base des troncs. De plus, cette espèce présente des caractéristiques morpho-anatomiques similaires à *Collema fuscovirens* (cf. 2.1.4.3.) et *Leptogium plicatile*.



*Collema cristatum*<sup>67</sup>

***Collema cristatum*** : Lichens à thalles foliacés pouvant atteindre jusqu'à 20 cm de large, ronds, semi-circulaires ou irréguliers se désintégrant au centre avec l'âge. Les lobes sont rayonnants ou alambiqués présentant des bords ondulés, entiers ou incisés. La surface supérieure des thalles est verte-olive à noire. Les apothécies sont généralement marginales, sessiles et bondées mais peuvent être parfois absentes. Les cyanobactéries forment des chaînes dont chaque cellule globuleuse individualisée est de l'ordre de 5-7 µm de diamètre. Ce lichen est communément retrouvé sur des substrats calcaires ou siliceux (roches ou/et sols) mais principalement dans les montagnes. Il est mentionné la présence de deux variétés pour cette espèce : var.

<sup>67</sup>Ahti, T., Jorgensen, P. M., Kristinsson, H., Moberg, R., Sochting, U., Thor, G. (2007) *Nordic Lichen Flora, Vol.3*; The Nordic, p. 219.



*cristatum* (présentant des lobes relativement courts et larges, plus ou moins imbriqués, souvent irrégulièrement ramifiés, abondamment divisés, onduleux et non isidiés) et var. *marginale* (présentant des lobes longs, devenant répétitivement fourchus, peu divisés, isidiés ou non).<sup>41,57,67</sup>



*Collema fuscovirens*<sup>67</sup>

***Collema fuscovirens*** : Les thalles lichéniques sont également foliacés de taille moyenne à grande, de 3-5 cm de large, pouvant être plus ou moins arrondis ou irréguliers. Les thalles sont également coriaces, profondément lobés de couleur verte-olive à noirâtre sur la face supérieure et plus clairs au niveau de la face inférieure. Les apothécies sont rares ou fréquentes, marginales lisses ou isidiées. A l'état humide, les thalles deviennent légèrement translucides mais peu gonflés. Les cyanobactéries sont organisées en chainettes dont les cellules globuleuses individualisées sont de 4-7  $\mu\text{m}$  de diamètre. Cette espèce peut être retrouvée sur des affleurements calcaires ensoleillés.<sup>41,57,67</sup>

### 2.1.1.3. Genre *Leptogium*

Le genre *Leptogium* comme vu précédemment (cf 2.1.4.) appartient également à la famille des *Collemataceae*. Le genre *Leptogium* comprend des espèces à thalles gélatineux, foliacés ou fruticuleux mais également des espèces lichéniques crustacées squamuleuses, de couleur sombre également allant du gris au brun noirâtre. Le genre *Leptogium* contrairement au genre *Collema* présente un thalle possédant un cortex (supérieur et inférieur ou une couche cellulaire) souvent présentant des poils en face inférieure. Les surfaces supérieures sont lisses ou ridées souvent avec des isidies. Ce genre comme les autres genres de la famille des *Collemataceae* sont des cyanolichens ayant comme photobionte le plus souvent une cyanobactérie du genre *Nostoc* sp.<sup>41,57,67</sup>



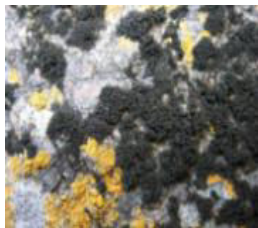
*Leptogium lichenoides*<sup>67</sup>

***Leptogium lichenoides*** : Lichens à thalles brun foncé ou gris-brun présentant des lobes denses avec de nombreuses projections digitées cylindriques sur les marges. La surface est fortement striée. Cette espèce est rarement fertile, les apothécies sont brun-rouge avec des isidies marginales. Les cyanobactéries sont organisées en courtes chaînes dont chaque cellule est de 4-6  $\mu\text{m}$  de diamètre.

Elle se localise entre les mousses aussi bien sur les arbres, les roches et le sol humide dans les vieux bois. Cette espèce est similaire à *L. gelatinosum* et à *L. pulvinatum*.<sup>41,57,67</sup>

#### 2.1.1.4. Genre *Lichina*

Les lichens de ce genre sont de type fruticuleux à branches circulaires à aplaties de coloration brun-noire. Ces espèces sont gélatineuses à l'état humide formant des coussins ou des tapis attachés au substrat par un crampon en forme de disque. Au sein du genre *Lichina*, deux espèces sont décrites : *L. confinis* (cf. 2.1.1.1.) et *L. pygmaea* (cf. 2.1.1.2.). Pour ces deux espèces, l'ensemble des réactions chimiques (réactions thallines) sont négatives. Le photobionte de ce genre appartient au genre *Calothrix* sp. (Cyanobactérie), il s'agit donc de cyanolichens.<sup>41,57,67</sup>



Photographie : Delphine PARROT

*Lichina confinis* : Lichen fruticuleux, gélatineux présentant des branches non aplaties plus ou moins dichotomiques. Le thalle est brun-olive sombre se développant sous la forme de petits coussins compacts parmi les algues sur le milieu de la rive supérieure. Les touffes sont rarement de plus de 5 mm, tandis que la surface couverte par ce lichen peut atteindre une longueur de 20 cm par 8 cm de largeur. La médulle et le cortex ne sont pas faciles à distinguer ; en effet, les deux étant une masse gélatineuse d'hyphes, de cellules d'algues et de cyanobactéries. Les apothécies sphériques de 0,5 mm de diamètre se trouvent aux extrémités des branches. Les ascospores sont simples, incolores,  $12-18 \times 10-15 \mu\text{m}$ .<sup>41,57,67</sup>

Localisés sur les côtes rocheuses, en particulier dans le nord et l'ouest de l'Europe, généralement juste en dessous de la zone d'éclaboussement et juste au-dessus des hautes eaux. Il est le plus abondant où le rivage est à l'abri du vent et exposé à la lumière directe. On le retrouve fréquemment en association avec *Caloplaca marina*, *Lecanora helicopis*, *Verrucaria maura*.<sup>41</sup>



Photographie : Delphine PARROT

*Lichina pygmaea* : Lichen à thalle noir mat-marron formant des touffes buissonnantes jusqu'à 1 cm de hauteur. Il se produit sous forme d'amas ou il peut également former des tapis étendus sur les rivages rocheux. Thalle composé de rameaux aplaties qui deviennent arrondis à leur extrémité. Les fructifications sont sphériques, jusqu'à 2 mm de diamètre se situant aux extrémités des branches.<sup>41,57,67</sup>

Il peut former de vastes tapis inégaux au niveau ou juste en dessous du niveau des hautes eaux de marées, dans des zones exposées et thermophiles. Cette espèce est généralement associée à la limite supérieure des balanes. Il est largement distribué autour de la Bretagne et de l'Irlande, sur les côtes rocheuses exposées. Cependant, *L. pygmaea* peut être confondu avec *L. confinis* et également avec *Catenella caespitosa* (algue rouge). Cette dernière est violette foncée, irrégulièrement ramifiée et limitée à l'humidité de crevasses et est localisée en surplomb sur le rivage.<sup>41</sup>



### 2.1.1.5. Genre *Synallissa*

Au sein du genre *Synallissa*, 37 espèces sont décrites, parmi celles-ci *S. symphorea*. Pour ces différentes espèces, l'ensemble des réactions chimiques (réactions thallines) sont négatives. Le photobionte de ce genre appartient au genre *Gloeocapsa* sp. (Cyanobactérie). De ce fait, les espèces de ce genre sont également des cyanolichens comme les espèces du genre *Lichina* sp. Les thalles sont fruticuleux et gélatineux à l'état humide, de couleur noire à brun rouge dont la surface est lisse ou rugueuse. Ils présentent une structure homomérique et aucun métabolite n'est décrit actuellement. Ce genre peut être aussi bien présent dans des zones arides, semi-arides que dans des zones tempérées chaudes. Il peut se développer sur des substrats variés : sols calcaires, roches calcaires et silicieuses.<sup>41,57,67</sup>



*Synallissa symphorea*<sup>67</sup>

***Synallissa symphorea* :** Les thalles forment de denses coussins noirâtres de 3 mm de hauteur et de largeur. Les branches sont droites ou couchées, simples et en partie inférieure granulaires et larges. La partie apicale est souvent constituée de structures globulaires. Les spores sont incolores simples, ellipsoïdes (7-12 x 6-9 µm). Les cyanobactéries sont situées dans les parties extérieures des thalles et au sein des hyphes médullaires dans les parties internes.

Elles forment des groupes de 2-3 cellules de 5-7 µm de diamètre chacune et sont entourées d'une gaine brune-rouge. Deux variétés sont également mentionnées au sein de cette espèce : var. *symphorea* et var. *sphaerospora*.<sup>67,68</sup> Cependant, aucune caractéristique morphologique les différenciant n'a pu être trouvée.

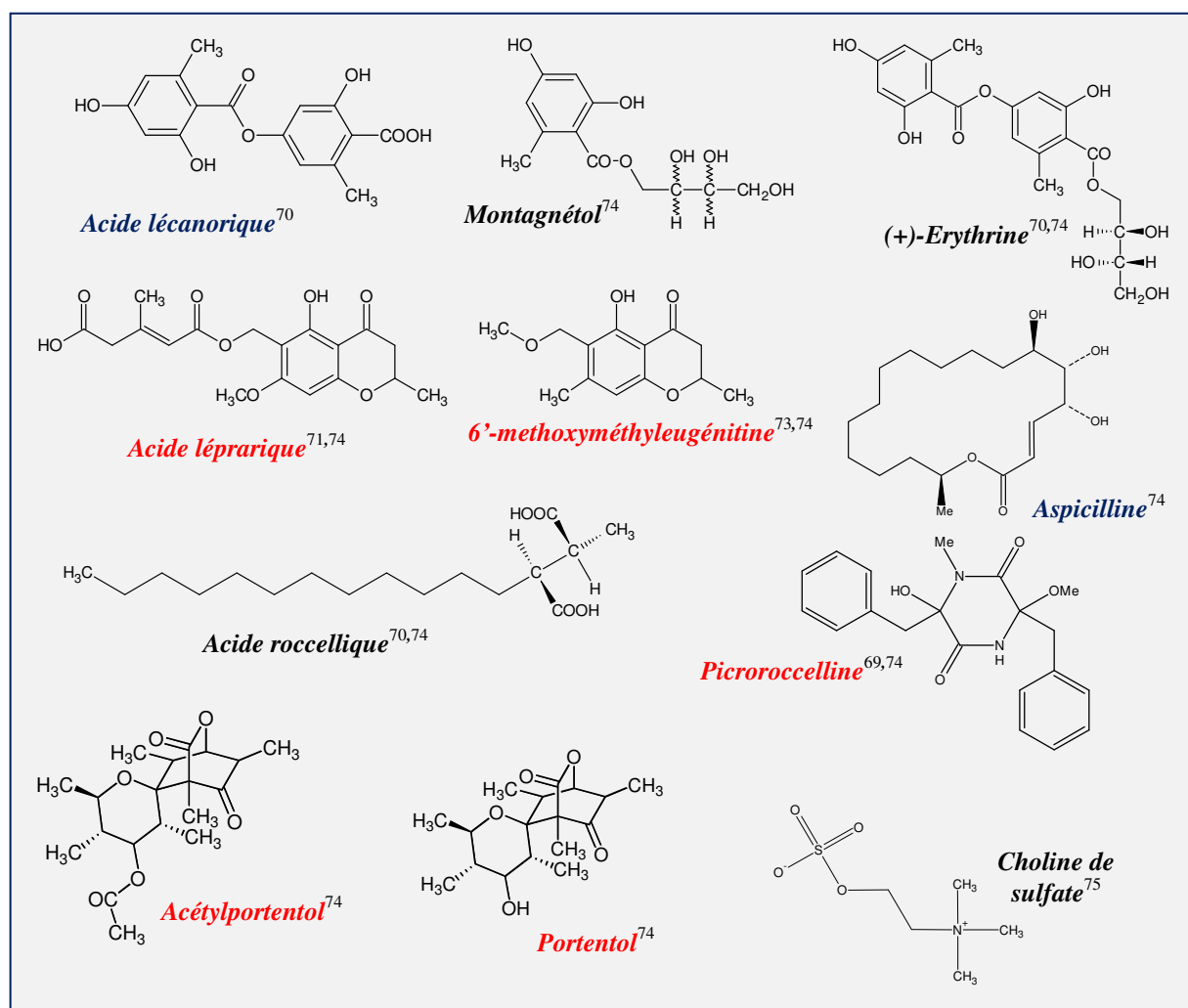
### 2.1.2. Composition chimiques et propriétés biologiques

En ce qui concerne les différentes espèces lichéniques étudiées, certaines d'entre elles présentent une composition chimique plus ou moins connue comme c'est le cas de *Roccella fuciformis*, *Roccella phycopsis*, *Collema cristatum* et de *Lichina pygmaea*. Au contraire, pour les autres espèces : *Collema auriforme*, *Collema fuscovirens*, *Lichina confinis* et *Synallissa symphorea*, leur composition chimique reste à ce jour énigmatique. Les différents métabolites pour chacune de ces espèces lichéniques ainsi que leurs activités biologiques, si celles-ci ont été décrites, sont regroupés dans la partie suivante.

<sup>68</sup>Tiévant, P. (2001) *Guide des Lichens*; Delachaux, Paris, p. 304.

### 2.1.2.1. *Rocella fuciformis* & *Rocella phycopsis*

Pour ces deux espèces confondues, 14 métabolites primaires ou spécialisés ont été décrits.<sup>69–75</sup> Il s'agit principalement de polyols (mésos-érythritol, mannitol, galactose, tagatose, arabitol), de composés aliphatiques ou cycliques (acide roccellique, sulfate de choline,  $\beta$ -carotène, portontol, acétylportontol, aspicilline, picroroccelline), de composés aromatiques (orsellinate d'éthyle et montagnétol), de depsides (érythrine, acide lécanorique) et de chromones (acide lépranique et eugénitine) (Figure 11). Par conséquent, une diversité structurale relativement importante existe pour ces deux espèces lichéniques.<sup>15</sup>



**Figure 11** : Structures des métabolites primaires et spécialisés décrits pour *R. fuciformis* & *R. phycopsis*.

En **rouge** : *R. fuciformis*, en **bleu** : *R. phycopsis*, en **noir** : *R. fuciformis* & *R. phycopsis*.

<sup>69</sup> Bohmana-Lindgren, G. (1972) *Tetrahedron* 28, 4625–4630.

<sup>70</sup> Strack, D., Feige, G. B., Kroll, R. (1979) *Zeitschrift für Naturforschung* 34c, 695–698.

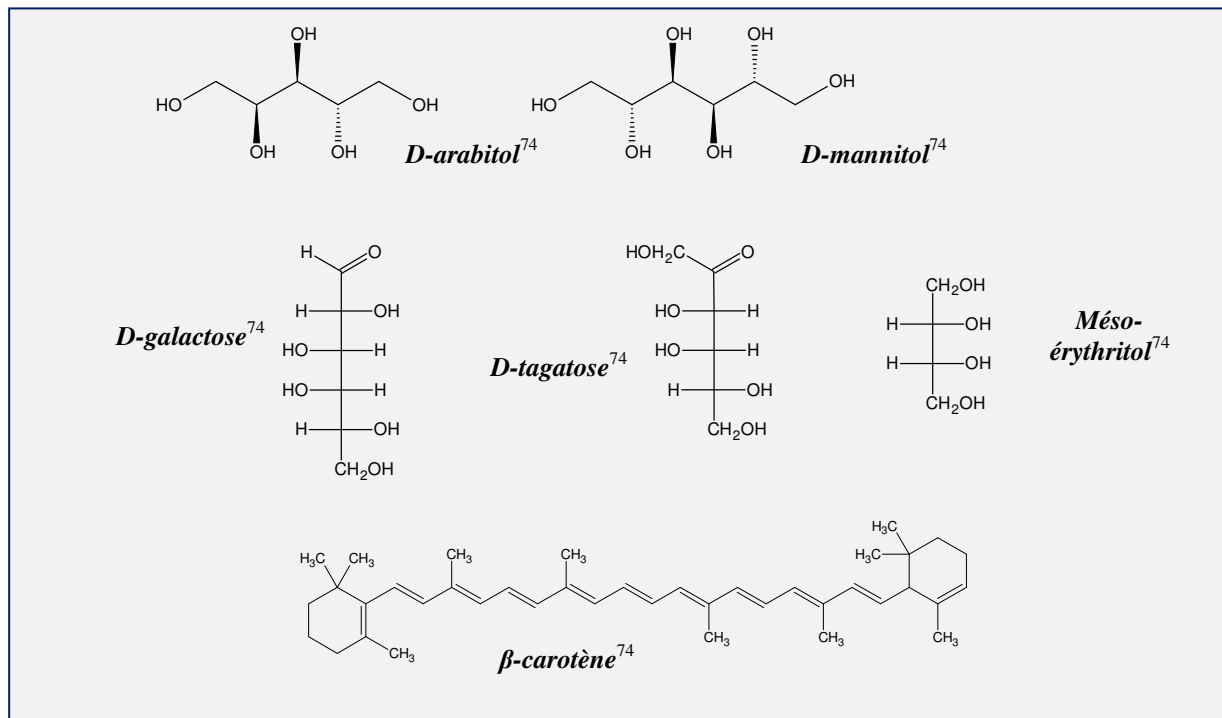
<sup>71</sup> Aberhart, D. J., Overton, K. H., Hunck, S. (1969) *Journal of Chemistry Society* 8, 704–707.

<sup>72</sup> Huneck, S., Yoshimura, I. (1996) *Identification of lichen substances*; Springer, Berlin, p. 493.

<sup>73</sup> Huneck, S. (1972) *Phytochemistry* 11, 1489–1490.

<sup>74</sup> Culberson, C. F. (1970) *Bryologist* 73, 177–377.

<sup>75</sup> Culberson, C. F. (1969) *Chemical and botanical guide to lichens products*; Lubrecht & Cramer LTD, p. 506.



**Figure 11 (suite) : Structures des métabolites primaires et spécialisés décrits pour *R. fuciformis* & *R. phycopsis*.**

En **rouge** : *R. fuciformis*, en **bleu** : *R. phycopsis*, en **noir** : *R. fuciformis* & *R. phycopsis*.

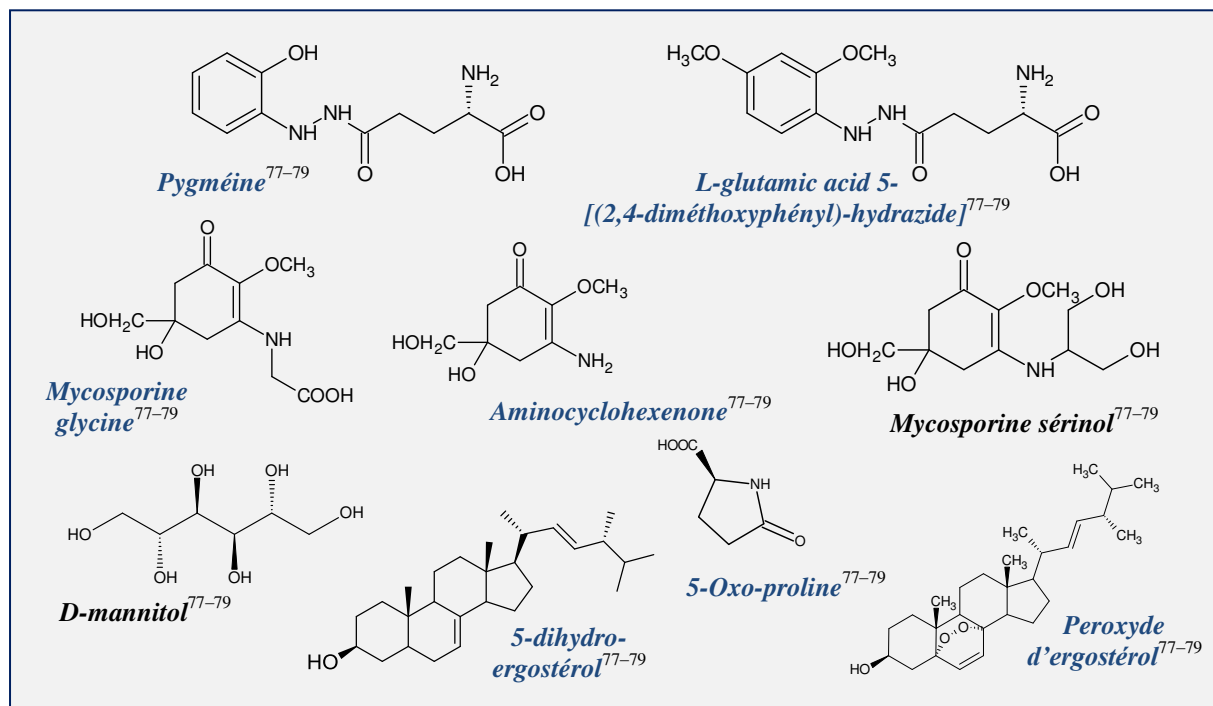
Parmi les métabolites reportés pour ces deux espèces (*R. fuciformis* et *R. phycopsis*) l'acide lécanorique a montré deux types d'activités principalement : (1) inhibiteur de la PTP1B (phosphotyrosine protéine phosphatase)<sup>23</sup> qui est impliquée dans la régulation négative de la signalisation de l'insuline par déphosphorylation des résidus du récepteur phosphotyrosine de l'insuline, et (2), des propriétés cytotoxiques modérées (acide lécanorique et ces dérivés orselliniques) vis-à-vis des lignées cellulaires cancéreuses suivantes : du larynx (HEP-2), du sein (MCF-7), du rein (786-0) et de mélanome murin (B16-F-10). Les dérivés (*n*-butyl, *n*-propyl, *n*-pentyl orsellinate) de l'acide lécanorique présenteraient une cytotoxicité plus importante (CI<sub>50</sub> entre 7 et 14 µg/mL pour les dérivés alors que la CI<sub>50</sub> de l'acide lécanorique et de l'orsellinate de méthyle était de 50 µg/mL).<sup>24,76</sup>

D'autre part, l'acide lépranique (une chromone isolée de *R. fuciformis*), montre une faible capacité d'absorption des rayons UVB par rapport aux UVC au vu de ses caractéristiques spectrales dans le THF à 240 (ε = 17 420 L/mol/cm), 250 (15 970), 257 (15 854) et 292 nm (4065).<sup>63</sup>

<sup>76</sup>Bogo, D., de Matos, M. F. C., Honda, N. K., Pontes, E. C., Oguma, P. M., da Santos, E. C. S., de Carvalho, J. E., and Nomizo, A. (2010) *Zeitschrift für Naturforschung C* 65, 43–8.

### 2.1.2.2. *Lichina confinis* & *L. pygmaea*

Pour ces deux espèces confondues, quelques métabolites primaires et spécifiques (9 composés) sont reportés<sup>77-79</sup> (**Figure 12**). Pour la plupart d'entre eux, se sont des composés azotés de type mycosporine ou mycosporine-like ayant une absorbance maximale entre  $\lambda$  310 et 362 nm et largement distribués au sein des milieux aquatiques et/ou des organismes marins.<sup>80,81</sup>



**Figure 12** : Structures des métabolites primaires et spécialisés décrits pour *L. confinis* & *L. pygmaea*

En **rouge** : *L. confinis*, en **bleu** : *L. pygmaea*, en **noir** : *L. confinis* & *L. pygmaea*

En terme d'activités biologiques, la mycosporine glycine a montré des propriétés antioxydantes<sup>60</sup> alors que la pygméine présente des propriétés cytotoxiques modérées ( $CI_{50}$   $14 \pm 2 \mu M$  sur les lignées cellulaires de mélanome murin B-16 au bout de 48h de traitement). Cependant, cette cytotoxicité reste beaucoup plus faible par rapport à celle du témoin utilisé (étoposide :  $CI_{50}$   $0.13 \pm 0.07 \mu M$ ).<sup>82</sup>

### 2.1.2.3. *Collema auriforme*, *Collema cristatum* & *Collema fuscovirens*

Au sein de ces trois espèces du genre *Collema*, quelques métabolites ont été reportés uniquement pour *C. cristatum*. Il s'agit d'acide gras, de lipides et de composés aromatiques. Au sein de

<sup>77</sup>Roullier, C., Chollet-Krugler, M., Bernard, A., and Boustie, J. (2009) *Journal of Chromatography B*. 877, 2067–73.

<sup>78</sup>Roullier, C., Chollet-Krugler, M., Pferschy-Wenzig, E.-M., Maillard, A., Rechberger, G. N., Legouin-Gargadennec, B., Bauer, R., and Boustie, J. (2011) *Phytochemistry* 72, 1348–57.

<sup>79</sup>Roullier, C. (2010) Thèse. Université de Rennes 1. p. 258

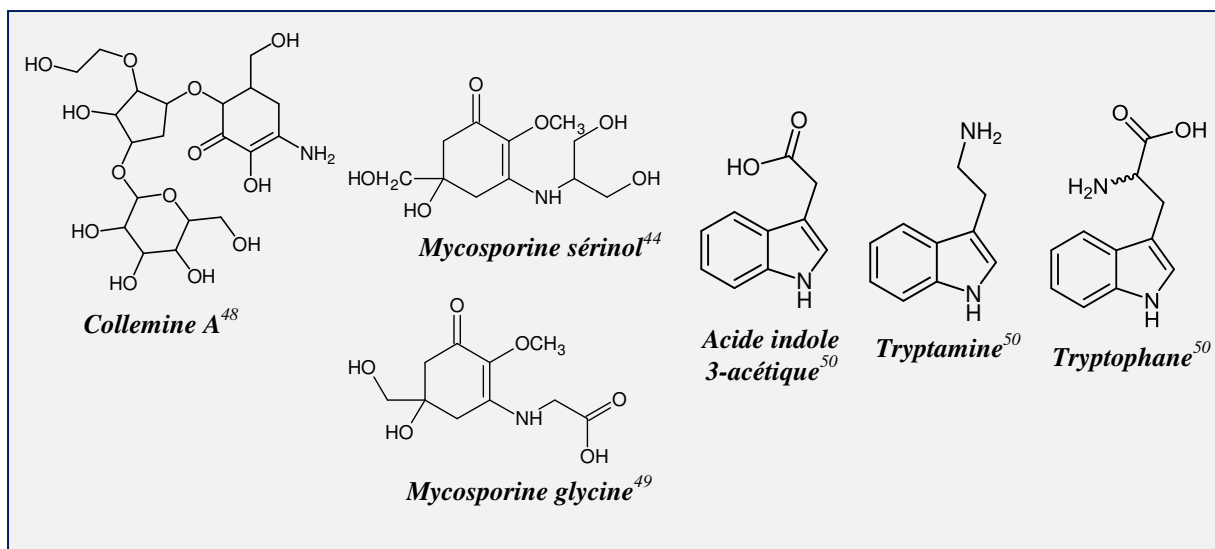
<sup>80</sup>Sinha, R. P., Singh, S. P., and Häder, D.-P. (2007) *Journal of Photochemistry Photobiology B*. 89, 29–35.

<sup>81</sup>Carreto, J. I., Carignan, M. O., and Montoya, N. G. (2004) *Marine Biology* 146, 237–252.

<sup>82</sup>Roullier, C., Chollet-Krugler, M., Weghe, P. Van De, Devehat, F. L.-L., and Boustie, J. (2010) *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters* 20, 4582–6.

cette espèce lichénique, des métabolites primaires : tryptamine et tryptophane ainsi que des lipides sont trouvés (majoritairement l'acide  $\alpha$ -linoléique, l'acide oléique et l'acide palmitique).

En termes de métabolites spécifiques, il est reporté la présence de collemine A, de mycosporine sérinol et d'alcaloïdes indoliques (acide indole 3-acétique). Il est également à noter la présence de mycosporine glycine au sein du genre *Collema* (Figure 13).<sup>79,83–85</sup>



**Figure 13 : Structures des métabolites primaires et spécialisés décrits pour *Collema cristatum***

La collemine A ( $\lambda_{\text{max}}$  311 nm), une mycosporine isolée à partir de *Collema cristatum*, a montré la capacité de prévenir des dommages induits par les UVB ( $\epsilon$  34400 L. mol<sup>-1</sup>. cm<sup>-1</sup>), tels que la destruction des cellules, la formation de dimères de pyrimidine et de l'érythème.<sup>63</sup>

#### 2.1.2.4. *Leptogium lichenoides* & *Synalissa symphorea*

En ce qui concerne ces deux espèces lichéniques, aucun métabolite primaire et/ou spécifique n'ont été précédemment reportés.

### 3. Conclusion

Les lichens sont donc des organismes complexes ayant la capacité à s'adapter à leurs environnements et produisant des métabolites spécifiques à forts potentiels biologiques variés. Les lichens sont également associés à des champignons épiphythiques et endophythes (plus de 1500 espèces sont décrites à l'heure actuelle).<sup>16,17,19,86</sup> Depuis quelques années, les lichens ont été également décrits comme présentant des communautés bactériennes à leur surface comme à l'intérieur du thalle lichénique (cf. Chapitre 2 - Les lichens : une nouvelle niche bactérienne ?). Ainsi, les lichens, définis comme l'association entre un photobionte et un mycobionte, constituent un véritable micro-

<sup>83</sup>Torres, A., Hochberg, M., Pergament, I., Smoum, R., Niddam, V., Dembitsky, V. M., Temina, M., Dor, I., Lev, O., Srebnik, M., Enk, C. D. (2004) *European Journal of Biochemistry* 271, 780–784.

<sup>84</sup>Büdel, B., Karsten, U., Garcia-Pichel, F. (1997) *Oecologia* 112, 165–172.

<sup>85</sup>Temina, M., Levitsky, D. O., Dembitsky, V. M. (2010) *Records of Natural Products* 4, 79–86.

<sup>86</sup>Honegger, R., Axe, L., Edwards, D. (2013) *Fungal Biology* 117, 512–518.

écosystème où les différents partenaires interagissent entre eux à des degrés plus ou moins définis. Ils constituent alors un modèle d'étude dans la compréhension des interactions symbiotiques mais également pour la recherche de molécules d'intérêts, et notamment celle à partir des communautés microbiennes (champignons comme bactéries) leur étant associées.



*PARTIE 2 - Etudes lichéniques :  
Profilages chimiques, identifications  
structurales et localisation in situ de  
métabolites*

---

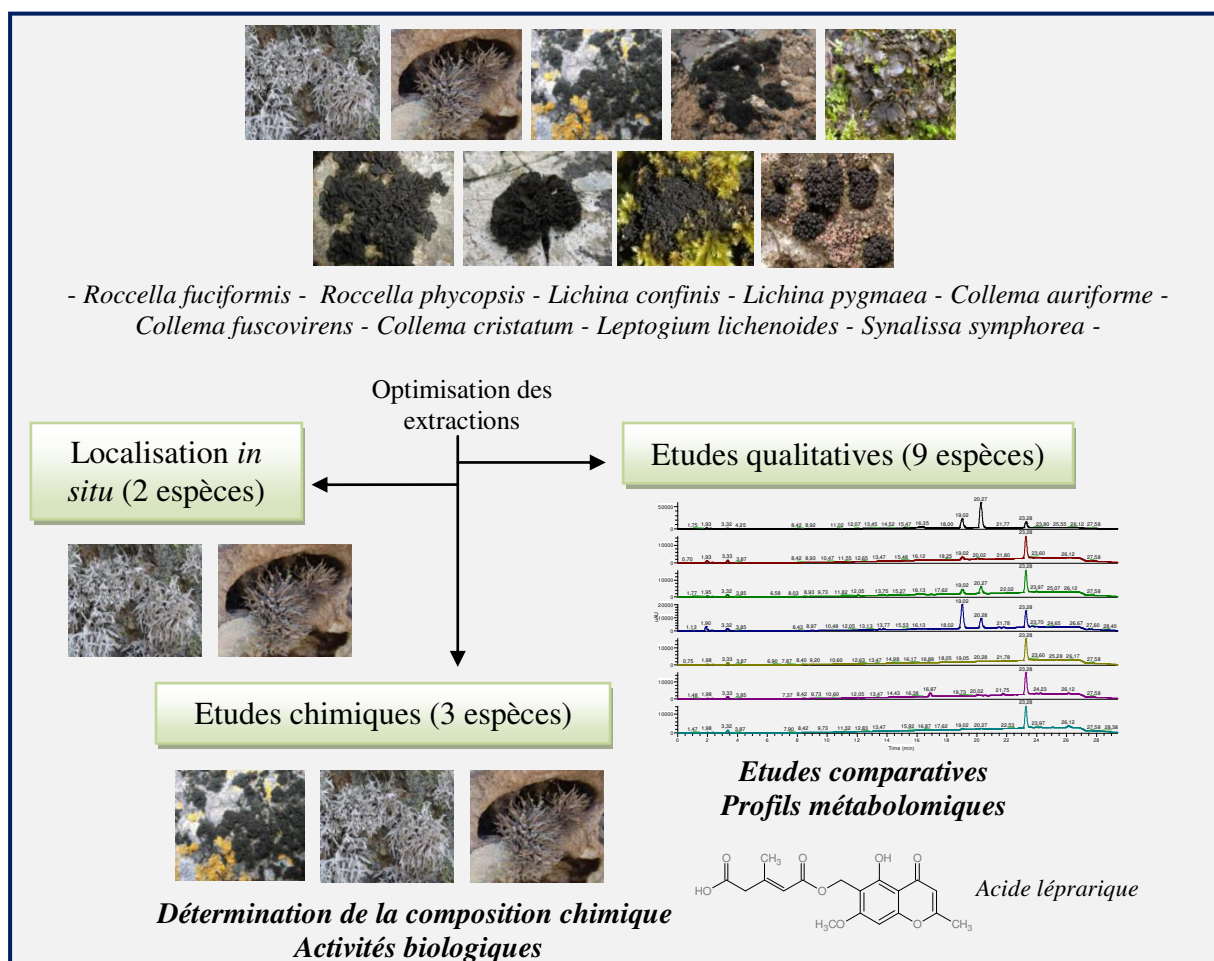




## 1. Objectifs des études lichéniques

Les neuf espèces lichéniques considérées au cours de cette étude seront soumises à une approche chimique plus ou moins complexe : profilages chimiques et/ou isolement, identification structurales et/ou localisation *in situ* de leurs principaux métabolites spécifiques.

Premièrement une optimisation des conditions d'extraction a été réalisée et appliquée à l'ensemble des espèces lichéniques étudiées. L'espèce du genre *Lichina confinis* a été également analysée par spectrométrie de masse de type DART. Une étude chimique sur deux lichens (*Roccella fuciformis* et *Roccella phycopsis*) a été menée : extractions, isollements, purifications et identifications structurales. Cette partie a fait l'objet d'une publication.<sup>87</sup> Les composés majoritaires et/ou ceux isolés en quantités suffisantes ainsi que les extraits totaux ont été soumis à des tests biologiques (activité antibactérienne) dans un but de mettre en relation l'impact de la diversité chimique des lichens sur les communautés bactériennes associées (cf. Chapitre 2 - Partie 3 - Extraits lichéniques/bactéries associées). Les propriétés antioxydantes, cytotoxiques et antibactériennes des métabolites produits ont été également déterminées (Figure 14).



**Figure 14** : Schéma récapitulatif de la partie 2 - Etudes lichéniques

<sup>87</sup>Parrot, D., Peresse, T., Hitti, E., Carrié, D., Grube, M., Tomasi, S. (2014) *Phytochemistry Analysis (sous presse)*

## 2. Résultats

### 2.1. Optimisation des conditions d'extraction

D'après les données bibliographiques disponibles (cf. Chapitre 1 - Les lichens : des micro-écosystèmes à eux seuls), il en résulte une similarité métabolomique entre les deux espèces lichéniques fruticuleux et maritimes : *Roccella fuciformis* et *R. phycopsis*, ainsi qu'une faible connaissance de la composition chimique des cyanolichens considérés. Lors d'une extraction, différents paramètres peuvent influencer son rendement. Leurs compositions en métabolites spécifiques connus étant peu complexes, il est nécessaire d'optimiser ces conditions d'extraction afin d'augmenter la probabilité de visualiser et d'identifier l'ensemble des métabolites spécialisés: les composés majoritaires aussi bien que les minoritaires. Pour cela un plan d'expérience a été mis en place à partir de *R. fuciformis* pour optimiser le rendement d'extraction et ainsi mettre en évidence les meilleurs paramètres d'extraction. Suite à cela, les conditions optimales ont été appliquées à l'ensemble des neuf espèces lichéniques considérées pour une étude qualitative de leurs profils chimiques.

#### 2.1.1. Mise en place du plan d'expérience

Dans un premier temps, le but a été de déterminer les conditions optimales d'extraction afin d'obtenir des profils chimiques les plus complets possibles, visualiser et identifier le maximum de composés présents dans les différentes espèces lichéniques étudiées. Pour cela, différents paramètres (qualitatifs et quantitatifs) pouvant influencer le rendement d'extraction ont été testés : le système de broyage (fin à grossier), le nombre de solvants d'extraction (1, 2 ou 4), le ratio solide/liquide (2/15, 2/30 et 2/60) ainsi que l'agitation (nulle à forte). Pour chacun de ces paramètres, 3 niveaux les constituent (**Tableau 2**). Par conséquent, 81 expériences seraient à réaliser. Mais, pour un gain de temps et de matière première, un plan d'expérience a été utilisé : la méthode de Taguchi ou plan  $L_9$  (méthode statistique).<sup>88</sup> Cette dernière a permis d'optimiser le rendement d'extraction en réalisant un minimum d'expériences. Ces optimisations ont été réalisées à partir de *R. fuciformis* pour deux principales raisons : (1) espèce lichénique présentant le profil chimique le plus complexe (cf. Chapitre 1 - Partie 1 - Généralités sur les lichens) et (2) disponibilité de composés purs isolés et identifiés. Pour ce plan d'expérience, une faible quantité de lichen (200 mg), 2 extractions successives par un même solvant et un temps d'extraction de 30 min pour chaque extraction ont été choisis. Ces derniers constituent les paramètres fixes de l'expérience.

<sup>88</sup>Mandal, V., Mohan, Y., Hemalatha, S. (2008) *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis* 46, 322–327.

**Tableau 2 : Paramètres et niveaux du plan de la méthode Taguchi (Plan orthogonal L<sub>9</sub>)**

Paramètres et niveaux utilisés pour le plan orthogonal L <sub>9</sub>				
Niveaux	Paramètres			
	[A] système de broyage	[B] solvants *	[C] volume de solvant (mL)	[D] agitation (rpm)
1	mixeur	1	2/15	absente
2	mortier	2 successifs	2/30	200
3	broyeur planétaire à boules**	4 successifs	2/60	700

\* : 1 solvant (acétone), 2 successifs (acétone, méthanol) et 4 successifs (cyclohexane, éther de diéthylique, acétone et méthanol) ; \*\* cf. Matériels & Méthodes

Par l'utilisation de ce plan orthogonal L<sub>9</sub>, neuf expériences désignées par ce dernier sont seulement à réaliser (**Tableau 3**).<sup>88</sup> Pour chacune de ces neuf expériences, le rendement d'extraction totale ainsi que le rendement d'extraction en érythrine et en acide lépranique ont été déterminés de la manière suivante :

$$\text{Rendement d'extraction totale \%} = \frac{\text{masse totale de l'extrait}}{\text{masse lichénique}} \times 100$$

$$\text{Rendement \%} = \frac{\text{masse du composé dans l'extrait}}{\text{masse lichénique}} \times 100$$

Chaque expérience a été réalisée en triplicat et des analyses statistiques (ANOVA) ont été effectuées. Les résultats obtenus ont permis de dégager les facteurs significatifs qui influencent le rendement d'extraction totale, le rendement d'extraction en érythrine et en acide lépranique et ainsi de déterminer les conditions optimales d'extraction et le meilleur rendement d'extraction en érythrine et en acide lépranique.

**Tableau 3 : Choix des expériences en fonction du plan orthogonal L<sub>9</sub>**

Expériences	Paramètres			
	[A]	[B]	[C]	[D]
1	1	1	1	1
2	1	2	2	2
3	1	3	3	3
4	2	1	2	3
5	2	2	3	1
6	2	3	1	2
7	3	1	3	2
8	3	2	1	3
9	3	3	2	1

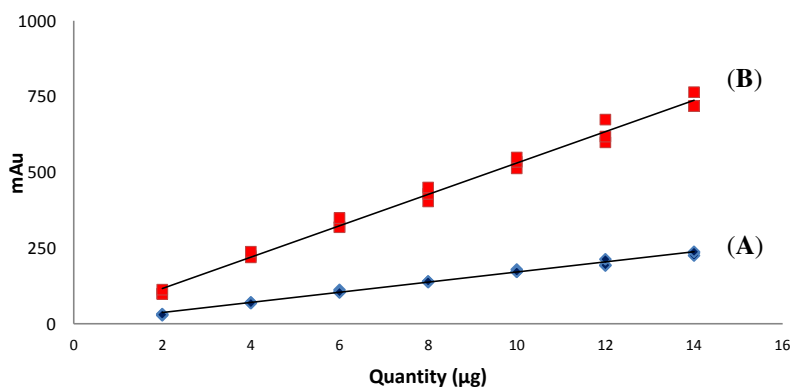
Les différents extraits obtenus ont été injectés par la suite en CLHP à une concentration de 1 mg/mL et la détection a été réalisée à 4 longueurs d'ondes : 254 nm, 280 nm, 312 nm et 365 nm.

### 2.1.2. Résultats du plan d'expérience

#### 2.1.2.1. Validation des droites d'étalonnage par CLHP : calibration et limites de détection

Une série de solution standard d'érythrine et d'acide léprarique variant de 2 à 14 mg ont été préparés afin de déterminer la linéarité de cette méthode. Les courbes d'étalonnage des solutions standards sont présentées **Figure 15**. Le coefficient de corrélation des courbes d'étalonnage sont de 0.9919 et 0.9913. Les valeurs de régression acceptables (FI) ont été déterminées : 259.20 pour l'érythrine et 239.19 pour l'acide léprarique. Ces valeurs sont supérieures à la valeur critique F (1, p (n-1), 1- $\alpha$ ) avec  $\alpha = 1\%$ , soit 8.862, les régressions sont donc acceptables. De plus, l'erreur de modèle et de la courbe dans le modèle (FNL) ont également été déterminées : -2.378 et -2.380 pour l'érythrine et l'acide léprarique respectivement. Ces valeurs étant inférieures ou égales à la valeur critique F (p-2, p (n-1), 1- $\alpha$ ) avec  $\alpha = 1\%$ , soit 4.695, la linéarité des droites a été validée. La limite de détection et de quantification ont été également déterminées: 0.79 et 2.08 mg pour l'érythrine et de 0.83 et 2.18 mg pour l'acide léprarique. Le test de comparaison de l'intersection avec 0 (test de Student) a été réalisé. Les valeurs obtenues étaient inférieures à la valeur critique t ( $\alpha$ , np-2) avec  $\alpha = 5\%$ , soit 1.26 pour l'érythrine et 1.34 pour l'acide léprarique contre 1.729 (valeur de la table de Student). Ainsi, l'ordonnée et l'origine peuvent être confondues et un seul point de gamme peut être réalisé avec les extraits à tester.<sup>89</sup> L'erreur standard d'expérimentation était respectivement de 3.5% et de 5.1% pour l'érythrine et l'acide léprarique.

(A)  $y = 16.7x + 3.90$  avec  $R^2 = 0.992$  et (B)  $y = 51.8x + 13.34$  avec  $R^2 = 0.991$



**Figure 15 :** Droites d'étalonnages de l'érythrine (A) et de l'acide léprarique (B) obtenues par CLHP

#### 2.1.2.2. Optimisation des conditions d'extraction totale

Les neuf expériences ont permis d'obtenir un modèle statistique identifiant les rendements du processus d'extraction (**Tableau 4** et **Annexe 1**). Et suite à ces résultats, des expériences supplémentaires (10 et 11) ont été effectuées. Le rendement (1) de l'extraction totale, (2) de l'érythrine

et (3) de l'acide lépranique varie de  $13 \pm 1.3$  à  $27 \pm 0.5\%$ ,  $5.1 \pm 0.2$  à  $13.4 \pm 0.8\%$ , de  $4.3 \pm 0.1$  à  $5.3 \pm 0.1\%$ . L'influence de chaque paramètre testé sur les rendements est présentée **Figure 16**.

Cette **Figure 16** a été réalisée à partir des données du **Tableau 4** afin de déterminer l'influence de chaque facteur (broyage, type de solvant, volume et agitation) sur le rendement d'extraction totale, le rendement d'érythrine et sur le rendement de l'acide lépranique.

Pour le rendement d'extraction totale, les conditions optimales étaient le broyage par mortier, l'utilisation de 2 solvants successifs (acétone, MeOH), un ratio solide/liquide de 2/60 et une agitation à 700 rpm (Expérience 10). Le rendement d'extraction a été augmenté par l'utilisation du broyage au mortier (de  $18.7 \pm 4.9\%$  ou de  $19.7 \pm 2.5\%$  à  $22.3 \pm 4\%$ ) et pour le nombre de solvant (de  $16.7 \pm 3.5\%$  à  $20.3 \pm 0.6\%$  ou à  $23.7 \pm 2.9\%$ ). Pour les deux autres paramètres mesurés (volume de solvant et agitation), la hausse du taux d'extraction était de  $18.3 \pm 4.7\%$  à  $21.7 \pm 5\%$  lorsque le ratio solide/liquide varie de 2/15 à 2/60 et de  $20.0 \pm 7\%$  à  $21.0 \pm 1\%$  lorsque l'agitation a été augmentée de 0 ou de 200 rpm à 700 rpm. Ainsi, le rendement d'extraction dans les meilleures conditions était de  $29.0 \pm 1.4\%$  (expérience 10) contre  $27.0 \pm 0.5\%$  (expérience 5) (**Tableau 4**).

Concernant le rendement en érythrine, le broyage le plus efficace correspondait à celui du mortier. Le rendement a été augmenté de  $5.3 \pm 0.2\%$  ou  $6 \pm 0.5\%$  à  $11.3 \pm 2.3\%$ . L'efficacité de rendement d'extraction du composé a été améliorée de  $7.5 \pm 3.6\%$  à  $8.3 \pm 4.4\%$  lorsque le nombre de solvant était augmenté de un à deux solvants successifs ou de  $6.8 \pm 1.9\%$  à  $8.3 \pm 4.4\%$  lorsque le nombre de solvant a été réduit de 4 à 2 solvants successifs. Le rendement d'érythrine a été fortement augmenté de  $6.7 \pm 1.9\%$  à  $8.0 \pm 4.6\%$  lorsque le ratio solide/liquide variait de 2/15 à 2/60. L'absence d'agitation (0 rpm) a permis d'obtenir le meilleur rendement ( $8.4 \pm 4.4\%$  contre  $6.7 \pm 1.9\%$  ou  $7.6 \pm 3.5\%$  pour 200 ou 700 rpm respectivement). La combinaison optimale de chaque variable [mortier, 2 solvants, ratio solide/liquide 2/60, 0 rpm] (expérience 5) a permis d'obtenir le meilleur rendement en érythrine (rendement =  $13.4 \pm 0.8\%$ ) (**Tableau 4**, **Figure 16**).

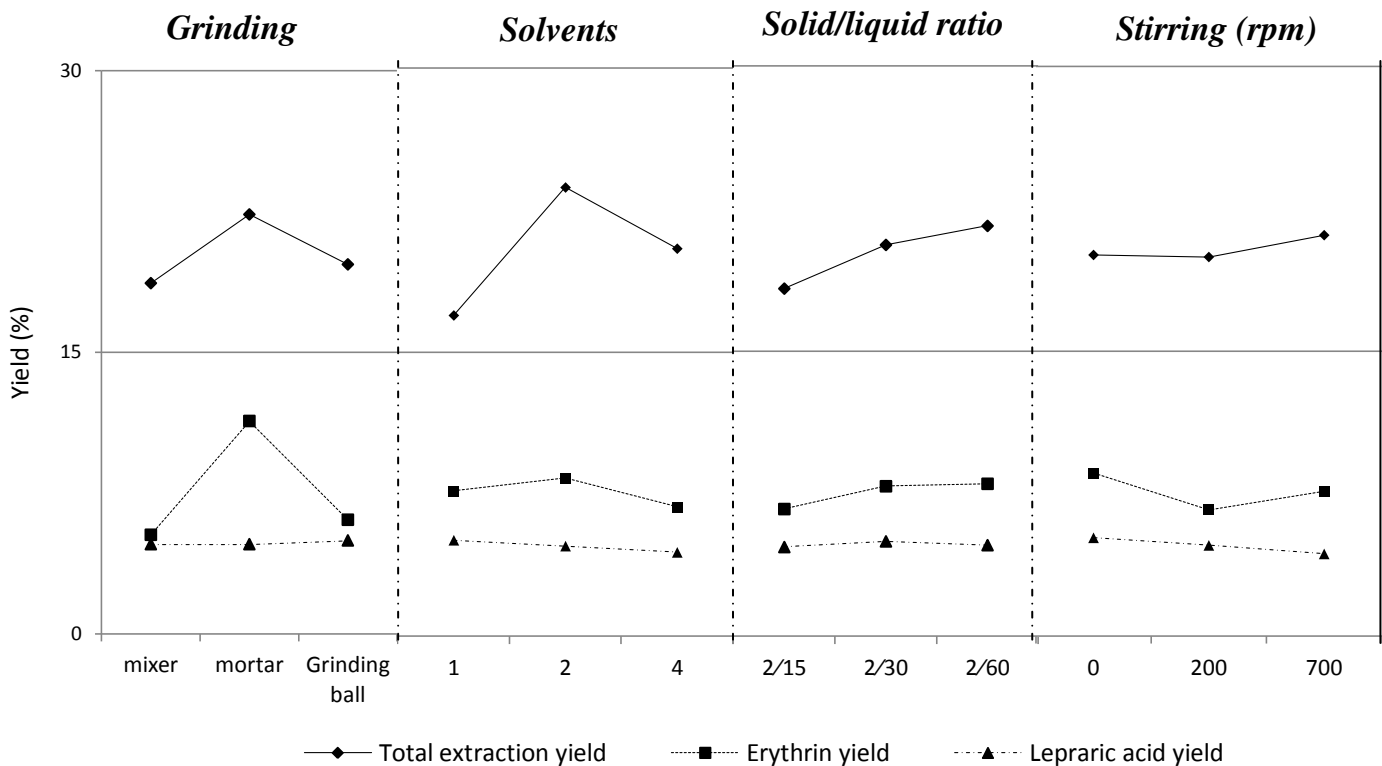
La **figure 16** a indiqué que le rendement d'extraction en acide lépranique était légèrement meilleur avec le broyeur planétaire comme système de broyage :  $4.9 \pm 0.4\%$ , contre  $4.8 \pm 0.4\%$  ou de  $4.8 \pm 0.3\%$  pour le mixeur et le broyeur planétaire respectivement (différences non significatives, **Annexe 1**). Ainsi, une combinaison de : 1 solvant, 0 rpm et un ratio solide/liquide 2/30 se sont révélés comme étant les paramètres les plus efficaces (rendement respectif de  $5.0 \pm 0.1\%$ ,  $5.2 \pm 0.1\%$  et  $5.0 \pm 0.3\%$  pour chaque paramètre pris indépendamment). La meilleure combinaison [broyeur planétaire, 1 solvant, ratio solide/liquide 2/30, 0 rpm] (Expérience 11) a montré le meilleur rendement d'extraction en acide lépranique (rendement =  $10.7 \pm 0.8\%$ ) (**Tableau 4**).

<sup>89</sup> Amarouche, S. (2013) *Techniques de l'ingénieur, Ressources documentaires : Qualité de laboratoire* 1-18

**Tableau 4** : Conditions du plan d'expérience (L9) et des expériences complémentaires (10 et 11) et détermination des rendements d'extraction totaux (%), d'érythrine (%) et d'acide lépranique (%)  $\pm$  SD (déviati on standard).

Expériences	Facteurs				Rendement d'extraction total $\pm$ SD (%)	Rendement en érythrine (A) $\pm$ SD (%)	Rendement en acide lépranique (B) $\pm$ SD (%)
	[A]*	[B]	[C]	[D]			
1	mixeur	1	2/15	0	13 $\pm$ 1.3	5.2 $\pm$ 1	5.2 $\pm$ 0.5
2	mixeur	2	2/30	200	22 $\pm$ 0.9	5.5 $\pm$ 0.8	4.8 $\pm$ 0.5
3	mixeur	4	2/60	700	21 $\pm$ 1.4	5.1 $\pm$ 0.2	4.3 $\pm$ 0.1
4	mortier	1	2/30	700	20 $\pm$ 0.4	11.7 $\pm$ 0.7	4.9 $\pm$ 0.2
5	mortier	2	2/60	0	27 $\pm$ 0.5	<b>13.4 <math>\pm</math> 0.8</b>	5.0 $\pm$ 0.2
6	mortier	4	2/15	200	20 $\pm$ 1.3	8.9 $\pm$ 0.8	4.4 $\pm$ 0.04
7	BB	1	2/60	200	17 $\pm$ 0.1	5.6 $\pm$ 0.3	5.1 $\pm$ 0.1
8	BB	2	2/15	700	22 $\pm$ 1.1	6.1 $\pm$ 0.7	4.5 $\pm$ 0.8
9	BB	4	2/30	0	20 $\pm$ 0.7	6.5 $\pm$ 0.1	5.3 $\pm$ 0.1
10	mortier	2	2/60	700	<b>29 <math>\pm</math> 1.4</b>	14.2 $\pm$ 0.2	8.1 $\pm$ 0.8
11	BB	1	2/30	0	15 $\pm$ 0.8	7.8 $\pm$ 0.9	<b>10.7 <math>\pm</math> 0.8</b>

\* BB : broyeur planétaire à boules



**Figure 16** : Effets de chaque paramètre testé sur les différents rendements considérés pour l'optimisation

Un test ANOVA a été réalisé sur les résultats expérimentaux et a fourni un modèle statistique démontrant l'influence des variables sur le rendement d'extraction. Le test F et la p-value ont montré que les quatre paramètres ([A], [B], [C] et [D]) affectent de manière significative ( $p < 0,01$ ) le rendement d'extraction totale et le rendement en érythrine. Le rendement d'extraction en acide

léprarique est affecté de manière significative par un seul des paramètres testés : l'agitation (**Annexe 1**).

Par conséquent, selon les objectifs fixés, les paramètres à utiliser seront différents. Dans le cas présent, l'obtention du profil chimique le plus complet possible, c'est-à-dire ayant permis d'obtenir le meilleur rendement d'extraction totale correspond aux paramètres suivants: [mortier, 2 solvants, ratio solide/liquide 2/60, 700 rpm]. Ces derniers ont ensuite été appliqués aux neuf espèces lichéniques étudiées.

## 2.2. Profilage chimique des 9 espèces lichéniques

Les paramètres optimisés (mortier, 2 solvants, ratio solide/liquide 2/60, 700 rpm) ont été appliqués aux différents lichens afin de réaliser un profilage chimique qualitatif par LC-ESI-MS/MS en mode positif et négatif. Une approche de type « molecular networks » a également été réalisée afin de mettre en évidence la diversité métabolique de ces neuf espèces appartenant à des environnements différents (marins (*Lichina confinis* et *L. pygmaea*), maritimes (*Roccella fuciformis* et *R. phycopsis*) et terrestres (*Collema auriforme*, *C. cristatum*, *C. fuscovirens*, *Leptogium lichenoides* et *Synallissa symphorea*)) et possédant des localisations différentes (Erquy, Bretagne, France (*Lichina confinis*, *L. pygmaea*, *Roccella fuciformis* et *R. phycopsis*) et Kesselfallklamm, Région de Graz, Autriche (*Collema auriforme*, *C. cristatum*, *C. fuscovirens*, *Leptogium lichenoides* et *Synallissa symphorea*)).

### 2.2.1. Profilage chimique par LC-ESI-MS/MS de deux espèces lichéniques maritimes du genre *Roccella* : *R. fuciformis* & *R. phycopsis*

Les extraits ont été analysés par LC/MS (plateforme P2M2) et ont permis de mettre en évidence respectivement 10 et 9 composés au niveau des chromatogrammes UV (à 280 nm) et de masse (base peak) respectivement (**Figure 17 et 18, Tableau 5**).

Les 10 composés de type aromatique (au niveau des chromatogrammes UV) observés à 280 nm ont été observés à 5,60 min, 9,03 min, 11,65 min, 12,40 min, 12,42 min, 14,88 min, 14,92 min, 18,92 min, 20,47 min et 33,37 min. Parmi ces derniers, les composés **1**, **2**, **8** et **10** ont été observés au sein de ces deux espèces (**Figure 17**).

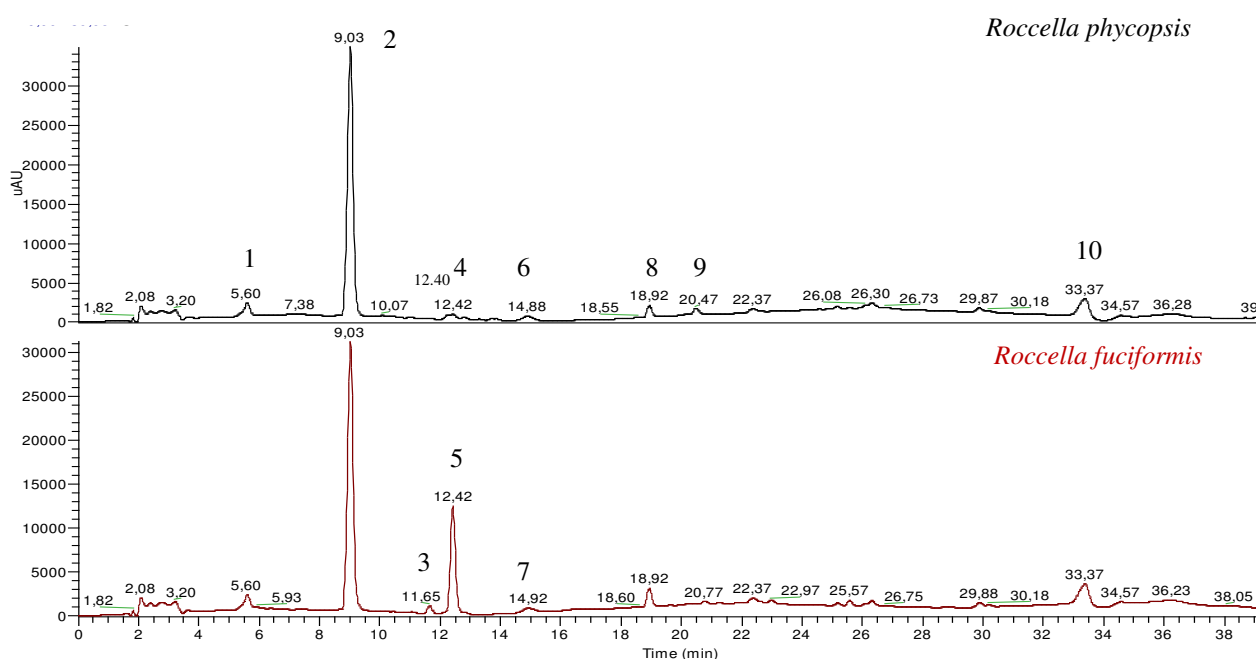
Les chromatogrammes de masse (rapport de  $m/z$  allant de 50 à 2000 uma) ont été enregistrés et 9 composés ont été visualisés (**A** à **I**). Leurs rapports  $[M-H]^+ m/z$  sont regroupés dans un intervalle de faible  $m/z$  : 137 à 723 uma. Par conséquent, les composés ionisés ont de faibles poids moléculaires à l'exception du composé **5** (PM 724 g.mol<sup>-1</sup>). Par l'analyse des données bibliographiques disponibles et/ou à l'aide d'une injection directe des composés purs, les composés **2**, **4**, **5**, **A**, **B** et **J** ont été identifiés comme pouvant potentiellement être l'érythrine, l'acide lécanorique, l'acide léprarique, le montagnétol, le  $\beta$ -orcinol et l'acide roccellique respectivement. La masse molaire (MM) de l'acide léprarique est de 362 g.mol<sup>-1</sup> hors, lors des analyses, un composé de masse molaire de 724 g.mol<sup>-1</sup> a été observé (**Figure 18, Tableau 5**).



Cette dernière correspond à 2 fois la masse molaire de l'acide léprarique donc à son dimère. Cette observation de dimérisation de l'acide léprarique dans la source a également été décrite<sup>90</sup> lors d'analyses en LC/MS en mode négatif uniquement. Ceci confirme la présence d'acide léprarique dans nos extraits analysés de *R. fuciformis*.

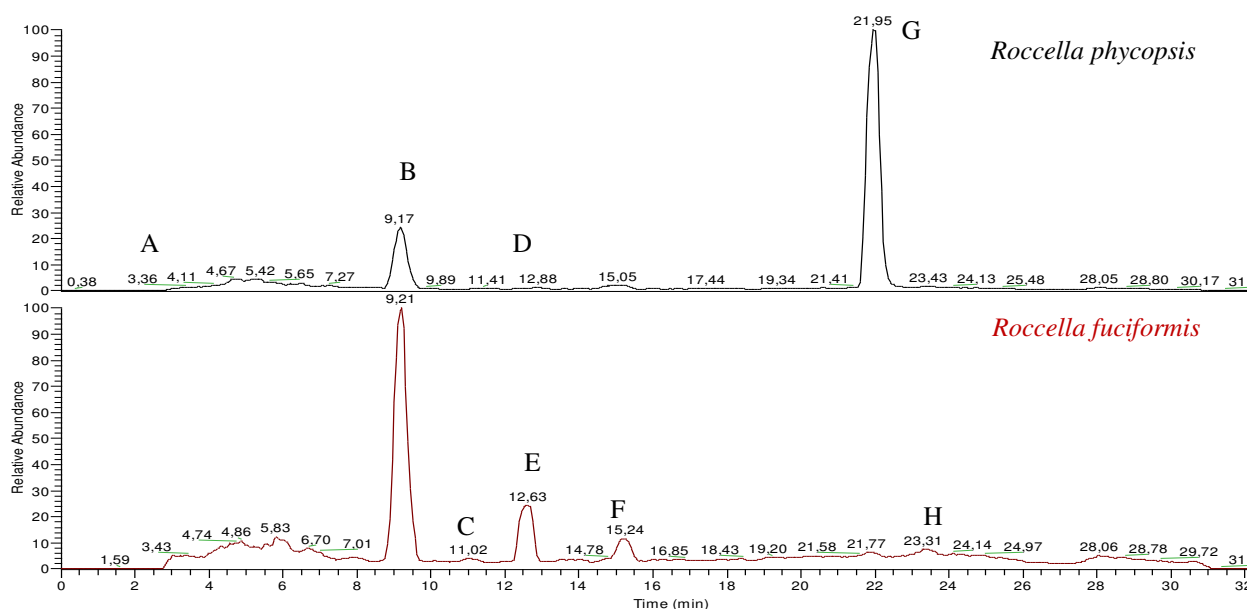
Outre ces composés majoritaires, plusieurs composés minoritaires ont également été observés soit en UV et/ou soit à partir des chromatogrammes de masse. Ainsi, 10 composés minoritaires supplémentaires (**1, 3, 6, 7, 8, 9, 10, C, F et G**) ont pu ainsi être mis en évidence mais restent non identifiés (**Tableau 5**).

Par conséquent, les deux lichens maritimes (*R. fuciformis* et *R. phycopsis*) ont montré de légères similitudes dans leurs profils métaboliques. En effet, 4 métabolites secondaires sont fréquemment observés: 3 composés inconnus à  $t_R$  5.60 min, 18.92 min et 33.37 min au niveau des chromatogrammes UV et 3 connus: l'érythrine, le montagnétol et l'acide roccelique ( $t_R$  9.03 min, 3.35 min et 21.95 min). Les autres métabolites connus sont des composés spécifiques, c'est-à-dire, qu'ils ont été uniquement retrouvés dans l'une des deux espèces lichéniques étudiées. Il s'agit de l'acide léprarique ( $t_R$  12.42) pour *R. fuciformis* et de l'acide lécanorique ( $t_R$  12.40) pour *R. phycopsis*.



**Figure 17 : Chromatogrammes UV (280 nm) de *R. phycopsis* et de *R. fuciformis***

<sup>90</sup>Laessøe, T., Srikritikulchai, P., Fournier, J., Köpcke, B., Stadler, M. (2010) *Fungal Biology* 114, 481–489.



**Figure 18 :** Chromatogrammes de masse (« base peak ») en mode négatif de *R. phycopsis* et de *R. fuciformis*

**Tableau 5 :** Récapitulatif des données LC-ESI-MS/MS (temps de rétention ( $t_R$ ), longueurs d'onde maximales, rapport  $[M-H]^-$   $m/z$  et ions produits (MS/MS) associés à leur intensité relative (I.R. %) respective)

No	$t_R$ (min)	UV $\lambda_{max}$ (nm)	$[M-H]^-$ $m/z$	Ions produits ( $m/z$ ) à 35 eV (I.R. %)	Identification <sup>1</sup>	Localisation	
						RF <sup>2</sup>	RP <sup>3</sup>
1	5.60	233 ; 257 ; 297	-	-	Inconnu	+	+
2 et B	9.03	233 ; 269 ; 302	421	167(100) ; 210(7.7) ; 269(13.4) ; 271(27) ; 324(7.4) ; 352(13.4) ; 353 (8.6) ; 374(17.4) ; 377(8.2) ; 419(12.5) ; 421(38) ; 439(13.1) ; 457(8.8)	Erythrine	+	+
3	11.65	234 ; 263 ; 290 ; 336	-	-	Inconnu	+	-
4 et D	12.40	233 ; 263 ; 280 ; 317 ; 336	317	167(100) ; 317(20.4)	Acide lécanorique	-	+
5 et E	12.42	235 ; 260 ; 293 ; 336	723	504(14.6) ; 557(21.7) ; 596 (75.9) ; 601(24.7) ; 619(25) ; 696(100) ; 742(42.96) ; 760(32.4)	Acide léprorique (dimérisé)	+	-
6	14.88	235 ; 263 ; 295 ; 311 ; 335	-	-	Inconnu	-	+
7	14.92	235 ; 263 ; 304 ; 335	-	-	Inconnu	+	-
8	18.92	235 ; 263 ; 280 ; 336	-	-	Inconnu	+	+
9	20.47	235 ; 263 ; 289 ; 336 ; 362	-	-	Inconnu	-	+
10	33.37	237 ; 263 ; 336	-	-	Inconnu	+	+
A	3.36	-	271	123(4.9) ; 149(92.6) ; 167(100) ; 271(45.4)	Montagnétol	+	+
C	11.02	-	376	375(100) ; 376(22.4)	Inconnu	+	-
F	15.24	-	251	182(0.4) ; 209(0.8) ; 251(100) ; 252(137)	Inconnu	+	-
G	21.95	-	299	255(0.3) ; 281(0.8) ; 298(2.3) ; 299(100)	Acide roccellique	+	+
H	23.31	-	265	97(0.8) ; 166(0.7) ; 265(100) ; 266(4.4)	Inconnu	+	-

<sup>1</sup> Identification à partir de la masse molaire des composés et des données bibliographiques disponibles sur *R. fuciformis* & *R. phycopsis*

- : absence du métabolite ; + : présence du métabolite

\* RF : *Rocella fuciformis* et RP : *Rocella phycopsis*

### 2.2.1.1. Fragmentation et hypothèses d'identification

Dans un but d'identification structurale, les spectres de masses obtenus par analyses LC/MS ( $m/z$  compris entre 50 et 2000 uma) des extraits de *R. fuciformis* et *R. phycopsis* ont été analysés

(Figures 19 et 20). A partir des ions moléculaires produits, des identifications ont été proposées à partir des données bibliographiques disponibles sur les lichens.<sup>71–73,91</sup>

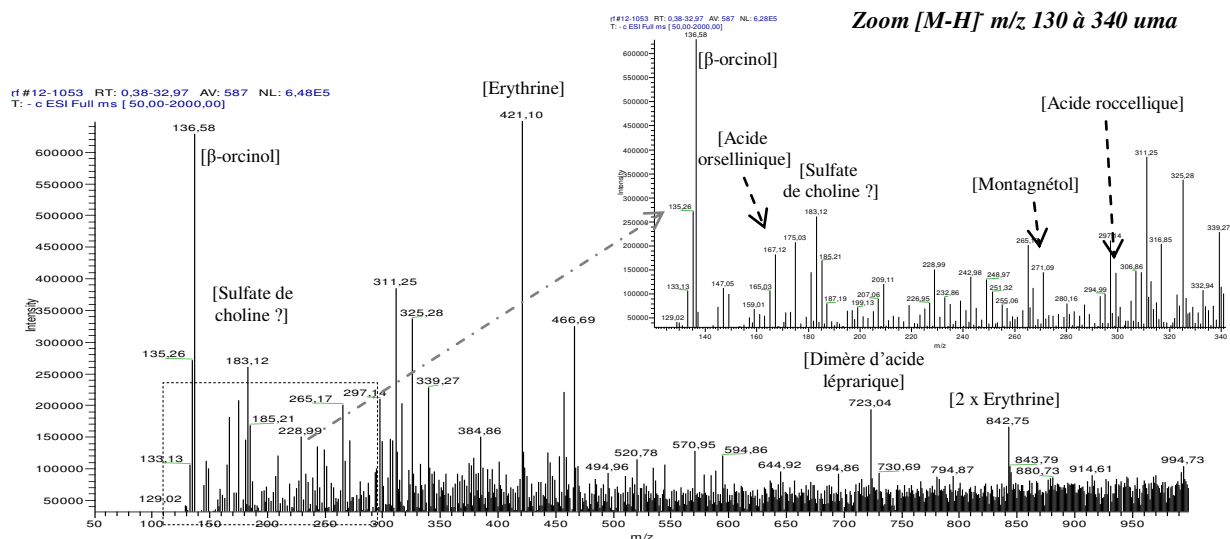


Figure 19 : Spectres de masses ( $[M-H]^-$   $m/z$ ) de *R. fuciformis*

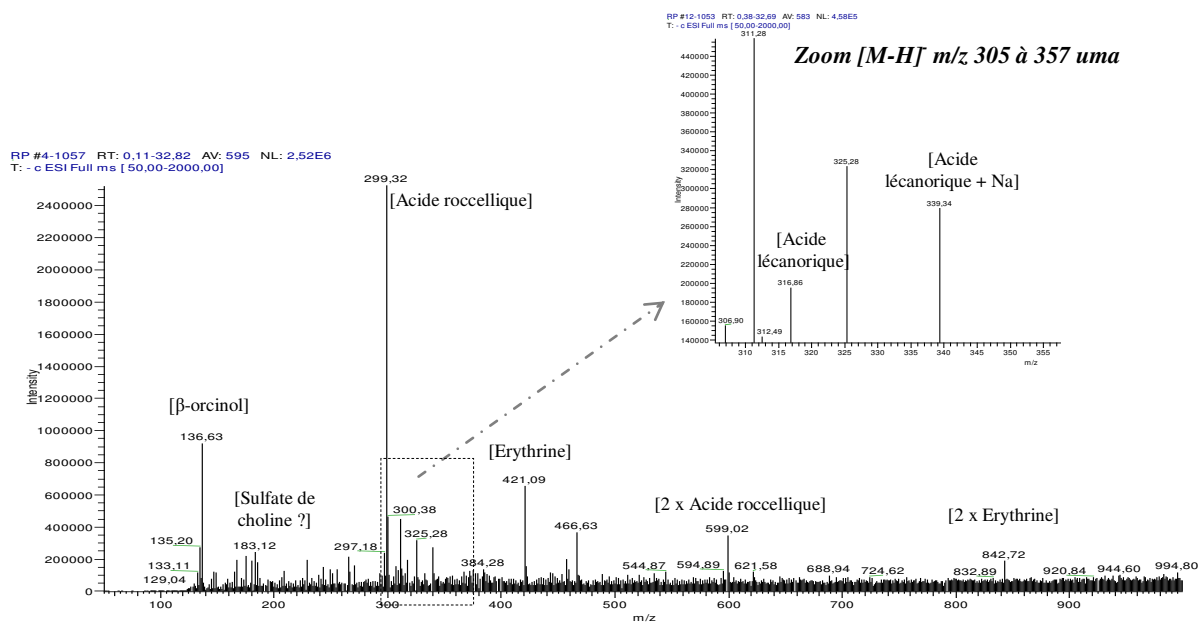


Figure 20 : Spectres de masses ( $[M-H]^-$   $m/z$ ) de *R. phycopsis*

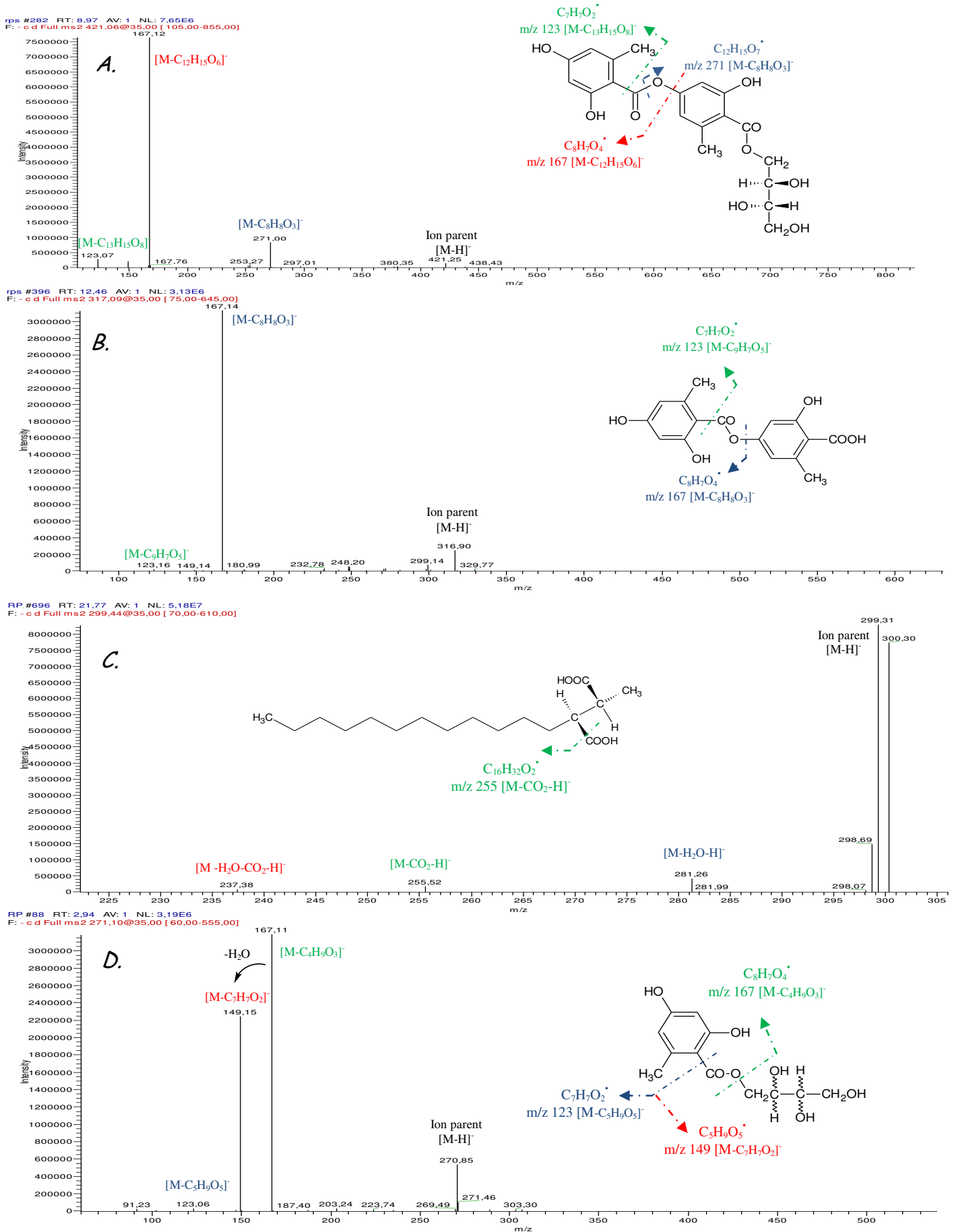
Ainsi, huit composés différents ont été mis en évidence à partir de leurs spectres de masse respectifs. Pour cinq de ces huit composés, leurs voies de fragmentation ont été proposées et détaillées (Figure 21).

Ainsi, la fragmentation de l'érythrine ( $m/z$  421  $[M-H]^-$ ) montre principalement 3 ions produits à  $m/z$  271, 167 et 123 uma. Le premier fragment correspond à une coupure au niveau de la fonction ester ( $C-COO-C$ ) et à une perte de 151 soit  $[M-C_8H_7O_3]^-$ . Le second correspond à l'acide orsellinique ( $[M-H]^-$   $m/z$  167). Enfin, le troisième ion produit correspond à une perte supplémentaire de 44 soit  $-CO_2$  par rapport au deuxième fragment. Ainsi, l'ion produit de  $[M-H]^-$   $m/z$  123 correspond au  $\beta$ -orceinol

<sup>91</sup>Huneck, S. (1968) *Tetrahedron* 24, 2707–2755.

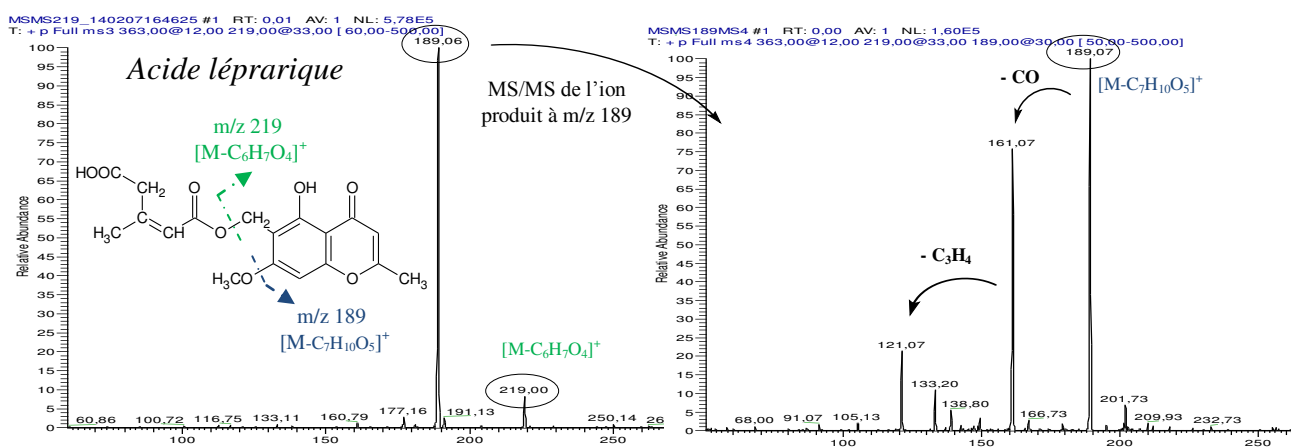
(C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>). La fragmentation de l'acide lécanorique présente 2 ions produits à  $m/z$  167 et 123 uma. Comme précédemment, le premier fragment correspond à l'acide orsellinique alors que le second à l'orcinol (perte supplémentaire de 44 soit un groupement CO<sub>2</sub>). En ce qui concerne la fragmentation de l'acide roccellique, 3 fragments sont principalement observés :  $m/z$  281, 255 et 237 uma. Le premier fragment correspond à une perte de 18 soit à une molécule d'eau alors que le second à une perte de 44 (soit un groupement CO<sub>2</sub>). Le troisième ion produit ( $m/z$  237) correspond à la perte combinée d'une molécule d'eau et d'un groupement CO<sub>2</sub> (perte de 62). Le montagnétol présente 3 fragments principaux à  $m/z$  167, 149 et 123 uma. Celui à  $m/z$  167 et 123 uma correspondent comme précédemment à l'acide orsellinique et à l'orcinol respectivement. L'ion produit de [M-H]<sup>-</sup>  $m/z$  149 correspond à un produit de formule brute C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>O<sub>5</sub>.

## Chapitre 1 - PARTIE 2 - Etudes lichéniques.

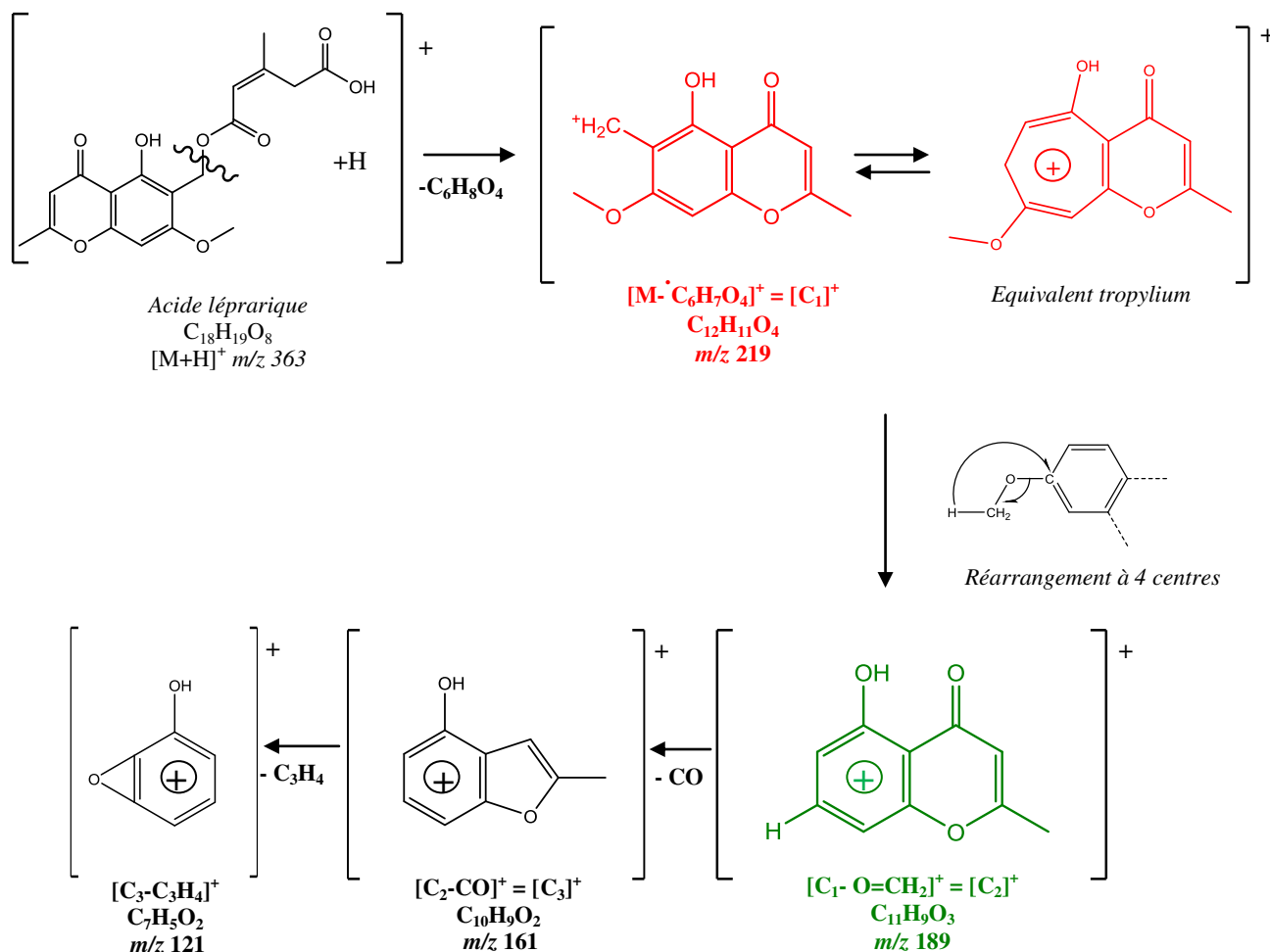


**Figure 21** : Spectres de masse ( $[M-H]^-$   $m/z$ ) et schéma de fragmentation des métabolites spécifiques de *R. fuciformis* & *R. phycopsis* (A - érythrine, B - acide lécanorique, C - acide roccellique, D - montagnétol)

Les spectres de masses de fragmentation de l'acide léprarique en mode positif ( $[M+H]^+$   $m/z$  363) ont montré 4 fragments majoritaires (**Figures 22 et 23**) :  $m/z$  219, 189, 161 et 121. L'ion  $m/z$  219 résulte de la perte du radical  $C_6H_7O_4$  par coupure en  $\beta$  du noyau aromatique pour conduire à la formation du cation  $[C_1]^+$  vraisemblablement stabilisé sous la forme d'une structure de type tropylium. Ce fragment perd ensuite une molécule de formaldéhyde (soit  $O=CH_2$  en moins) selon un réarrangement à 4 centres sur le groupement méthoxy (**Figure 23**). L'ion  $m/z$  189 résulte d'une extrusion de CO du noyau 4-pyrone conduisant à la formation du cycle à 5 chaînons stabilisé sous la forme d'un cation tropylium. Ce dernier perdant finalement  $C_3H_4$  conduit à la formation du cation de formule brute  $C_7H_5O_2$  à  $m/z$  121 (**Figure 23**).

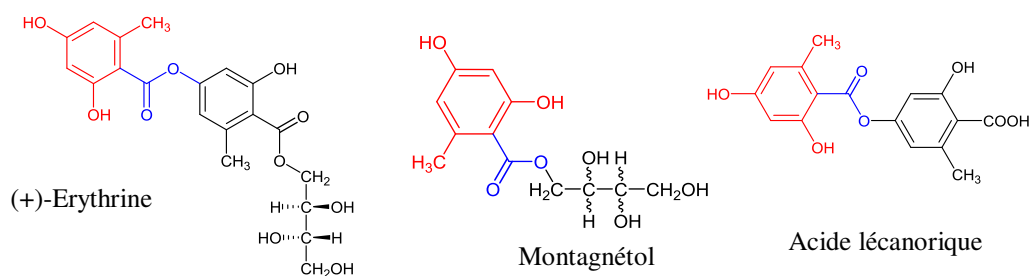


**Figure 22** : Spectres MS/MS de l'ion  $[M+H]^+$   $m/z$  363 et schéma de fragmentation de l'acide léprarique isolé de *R. fuciformis*



**Figure 23 :** Schéma général de fragmentation de l'acide léprarique ([M+H]<sup>+</sup> m/z 363)

En conclusion, les composés dérivant de la voie de l'orcinol (l'érythrine, l'acide lécanorique et le montagnétol) ont montré la présence de fragments identiques (m/z 167 et 123) (**Figure 24**).



**Figure 24 :** Similarités des voies de fragmentation des 3 métabolites dérivant de l'orcinol (en rouge : [M-H]<sup>-</sup> m/z 123 et en rouge + bleu : [M-H]<sup>-</sup> m/z 167)

### 2.2.2. Profilage chimique par LC-ESI-MS/MS de 7 cyanolichens

Les extraits des 7 cyanolichens ont été également analysés par LC/MS et ont permis de mettre en évidence respectivement 9 et 15 composés au niveau des chromatogrammes UV (total scan, 220-600 nm) et de masse (**Figures 25 et 26, Tableau 6**). Les 9 composés aromatiques (au niveau des chromatogrammes UV) ont été observés à 1,93 min, 2,17 min, 3,32 min, 16,87 min, 19,02 min, 20,27

min, 21,75 min, 23,28 min et 26,12 min. Parmi ces derniers, 4 composés (**1**, **2**, **3** et **8**) ont été observés pour l'ensemble des cyanolichens étudiés (**Figure 25**). Les chromatogrammes de masse (rapport de  $m/z$  allant de 50 à 2000) ont été comme précédemment enregistrés et 15 composés ont été visualisés (**A** à **O**). Leurs rapports  $[M+H]^+$   $m/z$  sont regroupés dans un intervalle de faible  $m/z$  : 145 à 375 uma. Par conséquent, les composés ionisés ont tous de faible poids moléculaire (**Figure 26** et **Tableau 6**).

Plusieurs composés majoritaires comme minoritaires ont été observés soit en UV et/ou soit à partir des chromatogrammes de masse. Un total de 23 métabolites spécialisés non identifiés a ainsi été mis en évidence au sein des 7 cyanolichens.

Ainsi, ces cyanolichens ont montré des similitudes dans leur composition chimique. Parmi les 3 espèces appartenant à la famille des *Lichinaceae* (*L. confinis*, *L. pygmaea* et *Synalissa symphoreae*), 8 composés diffèrent entre elles. En effet, les composés **1**, **5** et **6** sont présents uniquement au sein de *L. confinis* alors que les composés **F** et **I** par leur non observation, permettent de le différencier de *L. pygmaea* et *S. symphoreae*. La présence des composés **9** et **C** ainsi que la non observation du composé **H** au sein de *S. symphoreae*, permet de différencier le genre *Lichina* du genre *Synalissa*. Au sein de la famille des *Collemataceae* (*Collema auriforme*, *C. cristatum*, *C. fuscovirens* et *Leptogium lichenoides*), 5 composés (**4**, **5**, **7**, **D** et **J**) par leur présence (**4**, **7**, **D** et **J**) ou leur absence (**5**) permettent de différencier *Leptogium lichenoides* des espèces du genre *Collema* sp (**Figure 25 et 26**, **Tableau 6**).



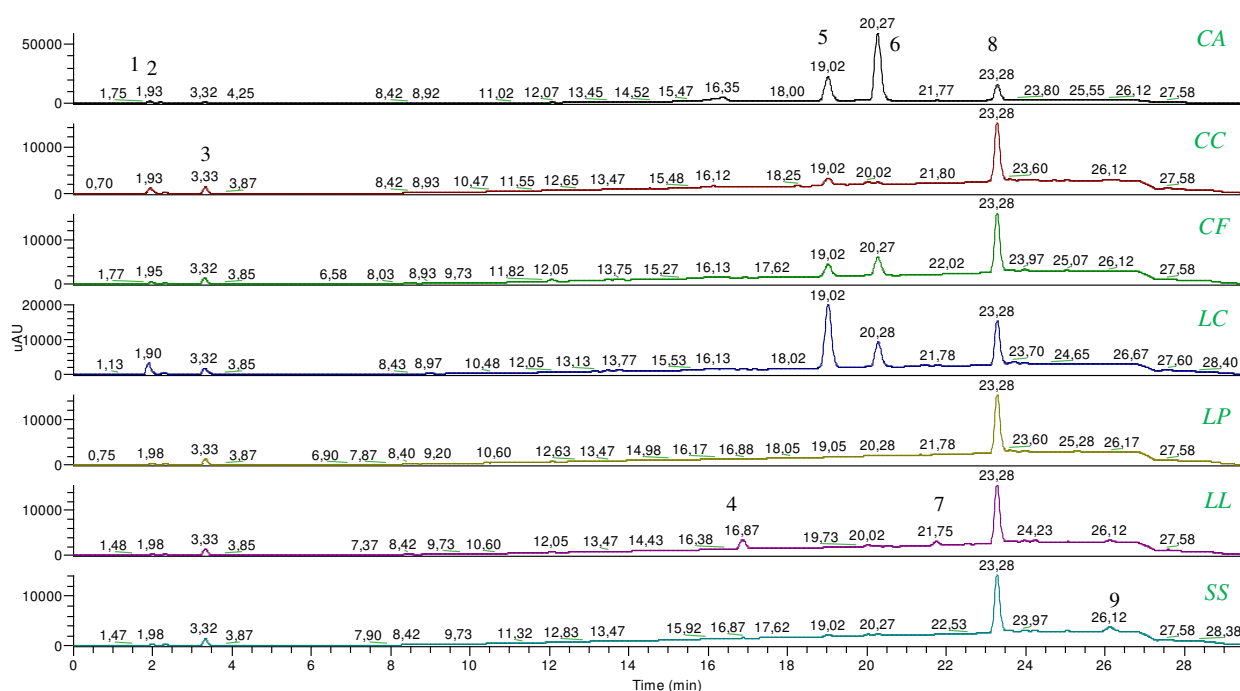


Figure 25 : Chromatogrammes UV (total scan) de CA (*C. auriforme*), CC (*C. cristatum*), CF (*C. fuscovirens*), LC (*L. confinis*), LP (*L. pygmaea*), LL (*Leptogium lichenoides*) et SS (*S. symphorea*)

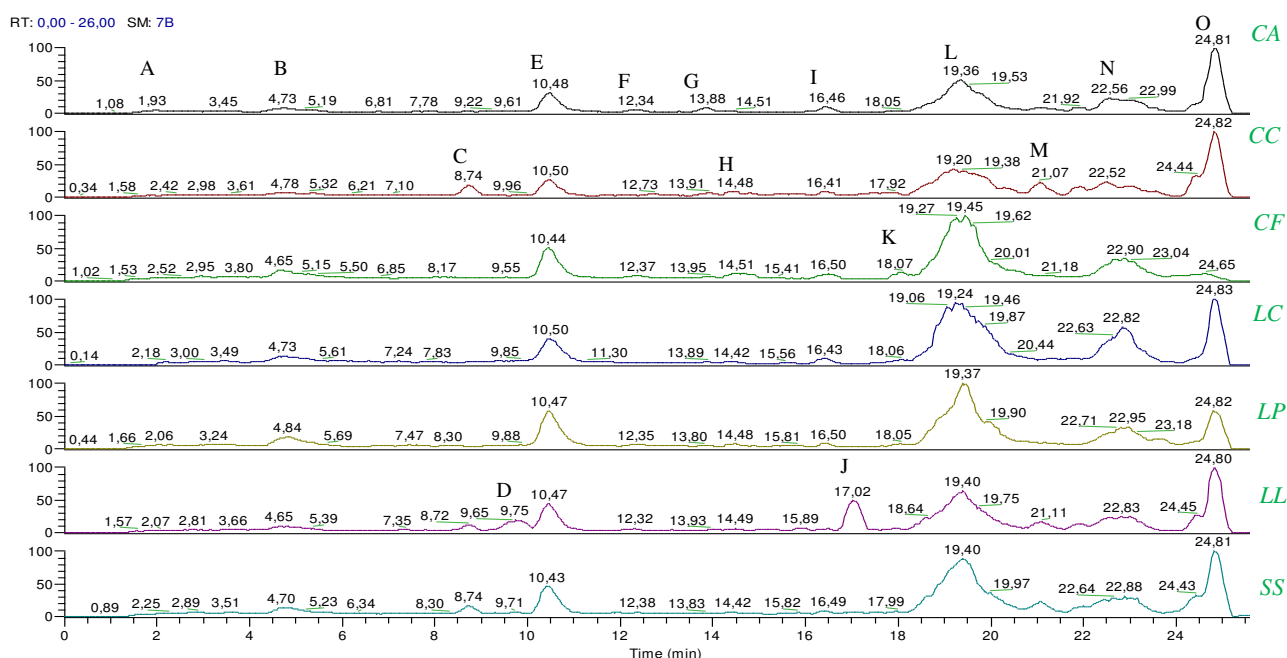


Figure 26 : Chromatogrammes de masse (base peak) en mode positif de CA (*C. auriforme*), CC (*C. cristatum*), CF (*C. fuscovirens*), LC (*L. confinis*), LP (*L. pygmaea*), LL (*Leptogium lichenoides*) et SS (*S. symphorea*)

**Tableau 6 : Récapitulatif des données LC-ESI-MS/MS (temps de rétention (RT), longueurs d'onde d'absorption maximale, rapport [M+H]<sup>+</sup> m/z et ions produits (MS/MS)**

No	t <sub>R</sub> (min)	UV λ <sub>max</sub> (nm)	[M+H] <sup>+</sup> m/z	Ions produits (m/z) à 35 eV (I.R.%)	Identification	Localisation						
						CA*	CC*	CF*	LC*	LP*	LL*	SS*
<b>1</b>	1.95	309; 336; 379	-	-	Inconnu	+	+	+	+	-	-	-
<b>2 et A</b>	1.98	308; 336; 489	262	166(10); 182(15); 194(34); 216(100); 226(10); 230(22.4); 244(63)	mycosporine serinol <sup>1</sup>	-	-	-	+	+	+	+
<b>3</b>	3.32	265	-	-	Inconnu	+	+	+	+	+	+	+
<b>4</b>	16.87	263; 288; 329	-	-	Inconnu	-	-	-	-	-	+	-
<b>5</b>	19.02	263; 317; 377; 387; 440; 484	-	-	Inconnu	+	+	+	+	-	-	-
<b>6</b>	20.27	263; 298; 334; 376; 387; 395; 492	-	-	Inconnu	+	-	+	+	-	-	-
<b>7</b>	21.75	263; 336; 489	-	-	Inconnu	-	-	-	-	-	+	-
<b>8</b>	23.28	262; 277	-	-	Inconnu	+	+	+	+	+	+	+
<b>9</b>	26.12	263; 285; 336; 489	-	-	Inconnu	-	-	-	-	-	-	+
<b>B</b>	4.73	-	145	55(1.4); 72(1.4); 73(100); 88(2.1); 99(1.7); 102(1.4); 127(5.5); 1128(6.9)	Inconnu	+	+	+	+	+	+	+
<b>C</b>	8.74	-	188	169(0.9); 170(100); 184(0.5)	Inconnu	-	+	-	-	-	-	+
<b>D</b>	9.75	-	240	108(77); 133(90); 195(8); 223(62); 240(100); 241(59)	Inconnu	-	-	-	-	-	+	-
<b>E</b>	10.48	-	163	55(2); 89(14); 101(6); 107(100); 125(2); 142(1); 145(4)	Inconnu	+	+	+	+	+	+	+
<b>F</b>	12.34	-	219	122(1.4); 161(1.4); 190(1); 203(100); 219(4)	Inconnu	+	-	+	-	+	+	+
<b>G</b>	13.88	-	274	106(4); 256(7); 274(100); 275(12)	Inconnu	+	-	-	-	-	-	-
<b>H</b>	14.51	-	343	107(1); 281(2); 240(100); 323(1)	Inconnu	-	+	+	+	+	+	-
<b>I</b>	16.46	-	371	147(54.5); 241(74.3); 259(100); 283 (21.5); 325(33); 342(37.5); 355(48); 371(32); 386(22.5)	Inconnu	+	+	+	+	+	-	+
<b>J</b>	17.02	-	375	115(5); 211(14); 319(42); 358(100); 359(11); 376(22)	Inconnu	-	-	-	-	-	+	-
<b>K</b>	18.07	-	332	240(9); 331(2); 332(100)	Inconnu	-	-	+	-	-	-	-
<b>L</b>	19.20	-	ND**	-	Inconnu	+	+	+	+	+	+	+
<b>M</b>	21.07	-	298	111(4); 153(5); 196(6); 245(18); 263(65.5); 280(100); 281(54); 298(18.5); 299(78)	Inconnu	-	+	-	-	-	-	-
<b>N</b>	22.56	-	ND**	-	Inconnu	+	+	+	+	+	+	+
<b>O</b>	24.81	-	282	114(2.2); 123(3.4); 134(2); 153(4); 170(4); 177(5); 184(6.6); 247(67); 256(100); 297(3.3)	Inconnu	+	+	+	+	+	+	+

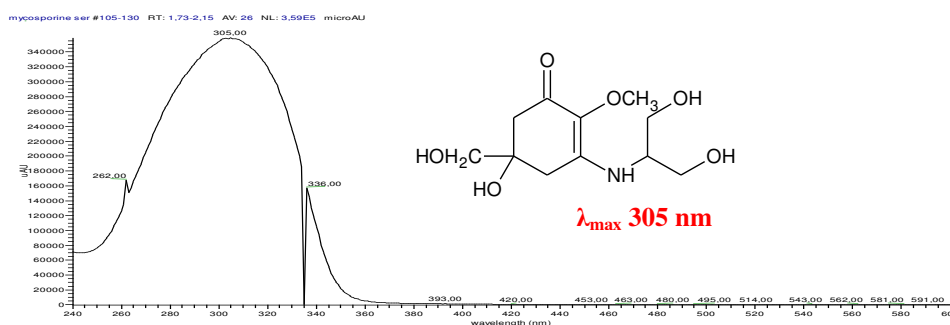
Chromatogrammes  
de type PDAChromatogrammes  
de masse (MS)<sup>1</sup> Identification à partir du composé pur ; \*\* non déterminé

- : absence du ou des métabolites ; + : présence du ou des métabolites

\*CA : *Collema auriforme* ; CC : *C. cristatum* ; CF : *C. fuscovirens* ; LC : *Lichina confinis* ; LP : *L. pygmaea* ; LL : *Leptogium lichenoïdes* et SS : *Synalissa symphorea*

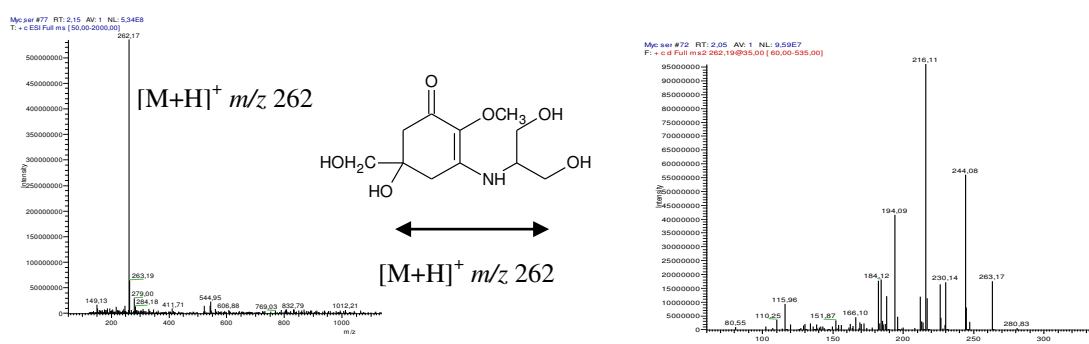
D'autre part, les cyanolichens comme d'autres sources d'origine marine et terrestre (champignons, cyanobactéries, macro-algues, phytoplanctons, invertébrés marins, zooplanctons et animaux) produisent potentiellement des composés de type mycosporine et/ou mycosporine like amino acids (MAAs).<sup>80,92</sup> Ces métabolites spécialisés possèdent des propriétés biologiques intéressantes : photoprotecteurs et antioxydants<sup>93</sup> ainsi que des rôles potentiels (controversés et/ou non confirmés) dans la régulation osmotique, la sporulation et la germination de certains champignons, la dessiccation ou lors de stress thermiques chez certains organismes ou encore un rôle de réservoir intracellulaire d'azote ... ainsi qu'une activité sur la reproduction d'invertébrés marins.<sup>93</sup> Ces composés présentent également des caractéristiques UV particulières, c'est-à-dire, un spectre d'absorbance compris entre 309 nm et 360 nm.<sup>63,78,92,93</sup>

D'après les résultats obtenus, deux de ces composés (composés **1** et **2**) présentent un spectre UV dans la zone des 308-336 nm et d'après Roullier et *al.*, (2011)<sup>78</sup>, une seule mycosporine commune à *L. confinis* et *L. pygmaea* a été décrite : il s'agit de la mycosporine sérinol (composé **2**) (**Figure 27**).



**Figure 27 : Structure et spectre UV (analyse LC/MS) de la mycosporine sérinol**

Cette identification a été confirmée par l'analyse (dans les mêmes conditions) du composé pur (disponible au laboratoire) par LC/MS. Les temps de rétention (1,93 min) ainsi que les spectres UV et de masse (MS et MS<sup>2</sup>) ont été trouvés identiques à 100% avec le composé **2** (**Figure 28**).



**Figure 28 : Spectre MS et MS/MS de la mycosporine sérinol**

Ainsi, à travers ce profilage chimique, 4 cyanolichens (*Lichina* sp., *Leptogium* sp. et *Synalissa* sp.) ont montré la capacité de synthétiser la mycosporine sérinol (**Tableau 6**).

<sup>92</sup>Whitehead, K., Hedges, J. I. (2002) *Marine Chemistry* 80, 27–39.

<sup>93</sup>Carreto, J. I., Carignan, M. O. (2011) *Marine Drugs* 9, 387–446.

D'après le **Tableau 6**, on a pu constater qu'un certain nombre de métabolites (**1, 2, 4, 5, 6, 7** et **9**) mis en évidence présentait une absorbance entre 310 et 362 nm voire même supérieure à 400 nm suggérant la présence potentielle de mycosporines, de mycosporine-like ou de molécules de structures particulières. Ainsi, certaines de ces molécules, d'après leurs caractéristiques UV ( $\lambda$  supérieur à 300 nm) présentent potentiellement des propriétés photoprotectrices.

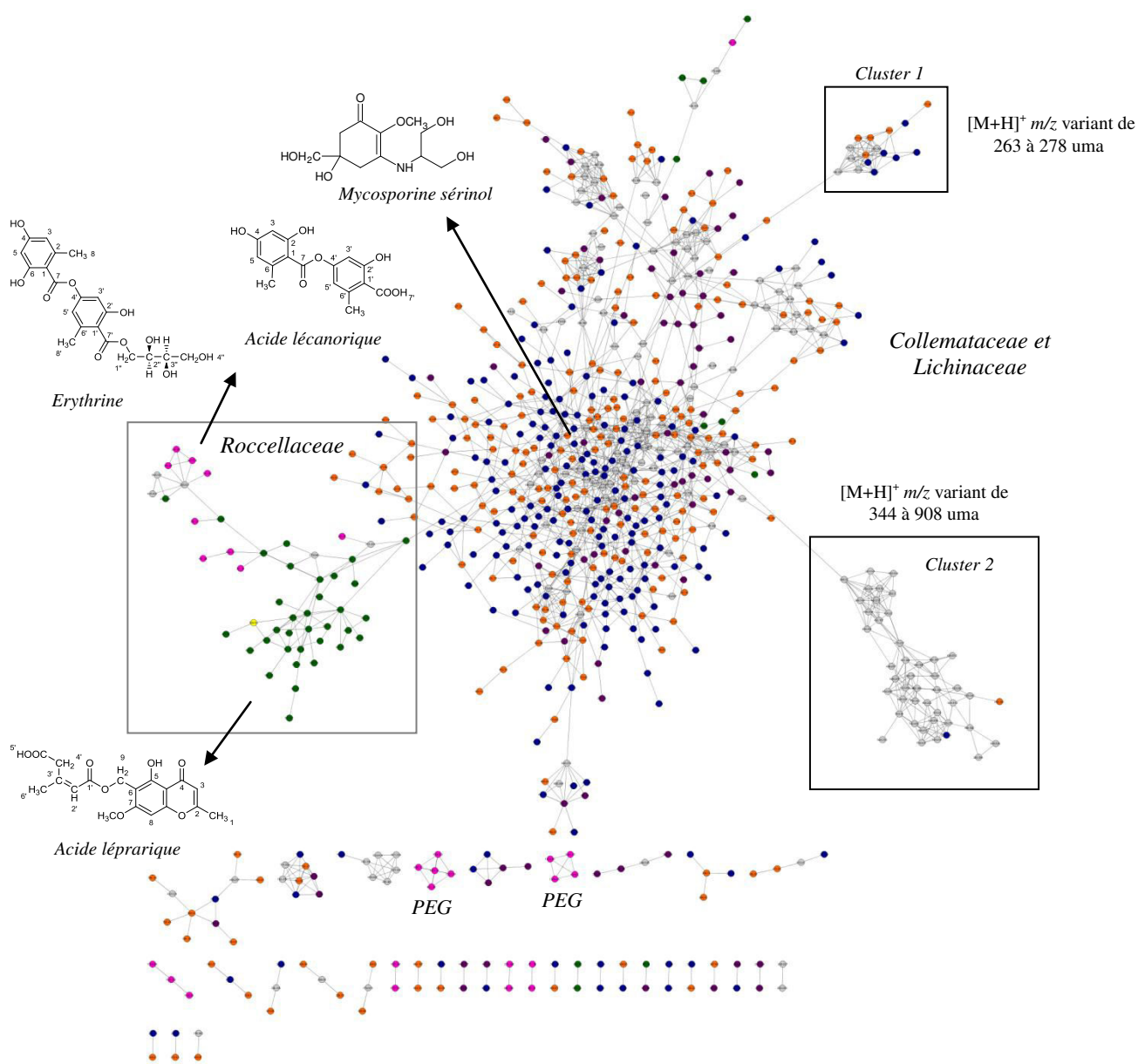
### 2.2.3. « Molecular Network » des profilages chimiques par LC/MS

Les données LC/MS de l'ensemble des lichens étudiés ont été analysées à l'aide de la plateforme GnPs (<http://gnps.ucsd.edu>) et visualisées par l'utilisation du logiciel Cytoscape (**Figure 29**). Ces analyses et représentations ont pour but d'organiser, de visualiser et de mettre en évidence des interconnexions entre des données LC-MS/MS en se basant sur les voies de fragmentation des composés présents. En d'autre terme, les composés (nœuds) présentant des voies de fragmentation communes auront une forte connection et ainsi seront liés entre eux (traits) lors de la visualisation de l'analyse par Cytoscape. Cette approche a pour but ici, de confirmer la similarité des profils chimiques des différents cyanolichens (*Collema* et *Lichina*) et des lichens à algues vertes (*Rocella fuciformis* et *R. phycopsis*) tout en prenant en compte l'ensemble des molécules ionisées (majoritaires comme minoritaires).

Ainsi, ces analyses et représentations ont permis de préciser la similarité des profils chimiques des différents cyanolichens considérés (*Collema* et *Lichina*). En effet, aucun groupe distinct entre les espèces de la famille des *Collema* et celle des *Lichina* n'a été mis en évidence. De plus, deux clusters (1 et 2) sont plus distants de l'ensemble des métabolites des cyanolichens. Ils sont ainsi constitués de molécules ayant des structures similaires et/ou des voies de fragmentations proches. Les métabolites du cluster 1 sont compris dans une étroite gamme de rapport  $[M+H]^+ m/z$  263 à 278 uma par comparaison au cluster 2 ( $[M+H]^+ m/z$  344 à 908 uma). Cependant, à l'heure actuelle, ces deux clusters ne peuvent pas être assimilés à un type structural particulier par manque d'information et de base de données sur la composition chimique de ces cyanolichens. Mais, de manière générale, l'ensemble des métabolites présents sont assez fortement interconnectés, c'est-à-dire, présentent des voies de fragmentation proches.

D'un autre côté, les deux espèces lichéniques à algue verte (*Rocella*) ont montré la présence d'un groupe très peu connecté aux profils chimiques des cyanolichens. Ceci s'explique en partie par leurs profils chimiques. En effet, les deux espèces du genre *Rocella* sont principalement constituées de molécules de type depsides (érythrone, acide lécanorique par exemple), de chromones (acide lépranique) ou encore d'acides aliphatiques (acide roccelique) alors que les cyanolichens sont connus pour produire des molécules de types mycosporines ou mycosporines-like. Par conséquent, les cyanolichens considérés se différenciaient parfaitement des lichens à algues vertes, ce qui précise donc la présence d'un métabolome qui leur est propre.

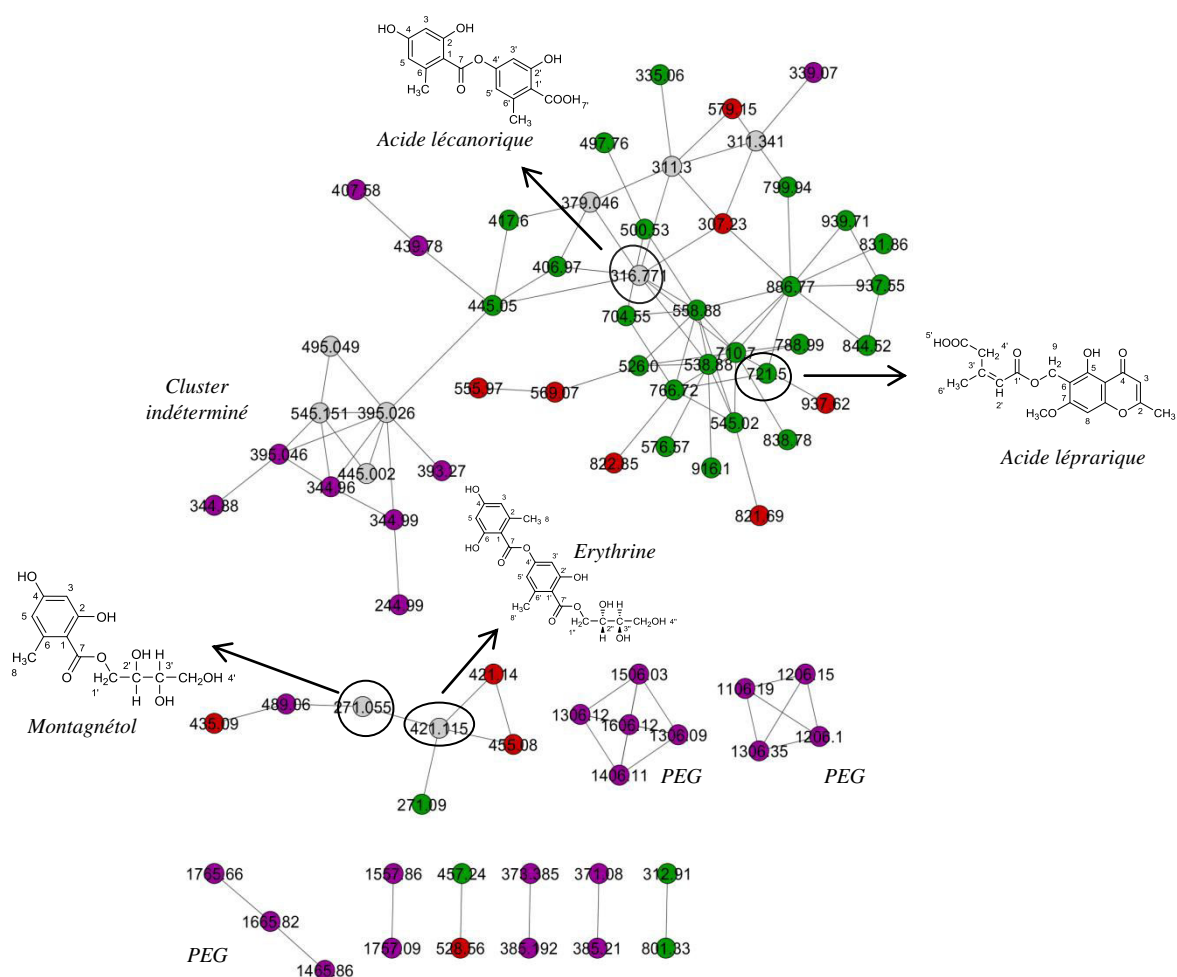
D'autre part, la présence potentielle de PEG (Polyéthylène glycol) au sein des extraits a pu ainsi être mise en évidence. Cette présence d'impuretés est liée aux différents matériels utilisés au cours de l'extraction, de la filtration des extraits ou encore lors de la séparation ou de la purification des composés purs.



**Figure 29 :** Visualisation par Cytoscape des interconnexions des spectres de masses de l'ensemble des espèces lichéniques étudiées

**Légende :** en **violet** : mycosporine sérinol témoin ; en **rose** : érythrine témoin ; en **orange** : Collemataceae (*Collema auriforme*, *C. cristatum*, *C. fuscovirens* et *Leptogium lichenoides*) ; en **bleu** : Lichinaceae (*Lichina confinis*, *L. pygmaea* et *Synalissa symphorea*) ; en **vert** : Roccellaceae (*Roccella fuciformis* et *R. phycopsis*) ; en **gris** : commun à au moins deux extraits.

Après considération uniquement des données LC/MS de *Rocella fuciformis* et *R. phycopsis*, on a pu constater la présence de l'érythrine et du montagnétol au sein d'un même cluster alors que l'acide lécanorique et l'acide léprarique étaient regroupés au sein d'un même cluster mais relativement peu connectés l'un à l'autre. Cela s'explique par la structure des molécules extrêmement proche et de leurs voies de fragmentation similaires entre l'érythrine et le montagnétol, comme vu précédemment (Cf. 2.2.1.1), alors que les deux autres métabolites appartiennent à des familles structurales différentes. En effet, l'acide lécanorique est une depside et l'acide léprarique une chromone. Cependant, cette analyse met en évidence la présence d'un cluster supplémentaire (cluster indéterminé) constitué de masses comprises entre  $[M-H]^-$   $m/z$  245 à 545 uma. Par conséquent, la similarité des profils chimiques entre *R. fuciformis* et *R. phycopsis* est à nouveau précisée et cette analyse a permis de mettre également en évidence un cluster constitué de métabolites non déterminés jusqu'à présent et ainsi un nombre non négligeable de molécules restant à identifier (**Figure 30**).



**Figure 30 :** Visualisation par Cytoscape des interconnexions des spectres de masses de *Rocella fuciformis*, *R. phycopsis* et de l'érythrine

**Légende :** en violet : érythrine témoin ; en vert : *Rocella fuciformis* ; en rouge : *R. phycopsis* et en gris : commun à au moins deux des trois extraits

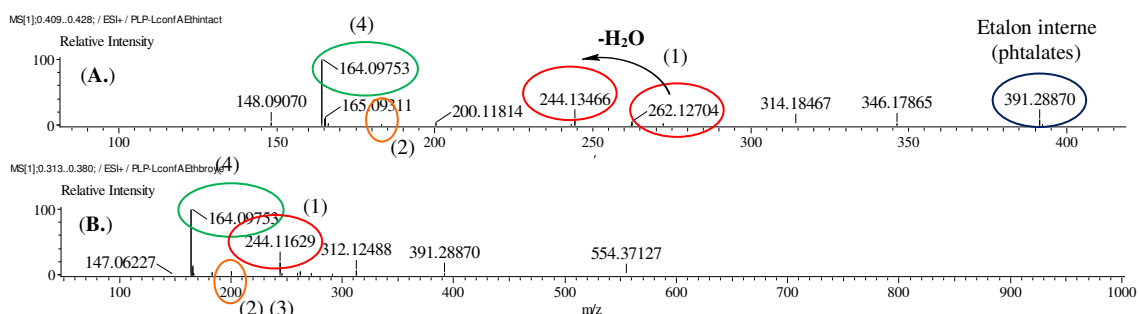
Ainsi, cette méthode d'analyse et de visualisation de données LC-MS/MS permet de mettre en évidence l'ensemble des molécules présentes et ionisées sans faire abstraction des composés minoritaires. Cependant, cette approche est fortement dépendante des conditions de séparation et d'ionisation des échantillons et également du type d'appareil utilisé (haute ou basse résolution). En l'occurrence, les conditions de séparation en LC-MS/MS, au vue des chromatogrammes obtenus pour les cyanolichens nécessitent une optimisation de séparation afin d'affiner les analyses.

Afin d'apporter des informations supplémentaires sur la composition chimique de ces cyanolichens, une étude de *Lichina confinis* par spectrométrie de masse de type DART a été réalisée en utilisant un protocole d'extraction décrits dans Roullier, 2010.

### 2.3. Profilage chimique de *Lichina confinis* par Direct Analysis in Real Time (DART)

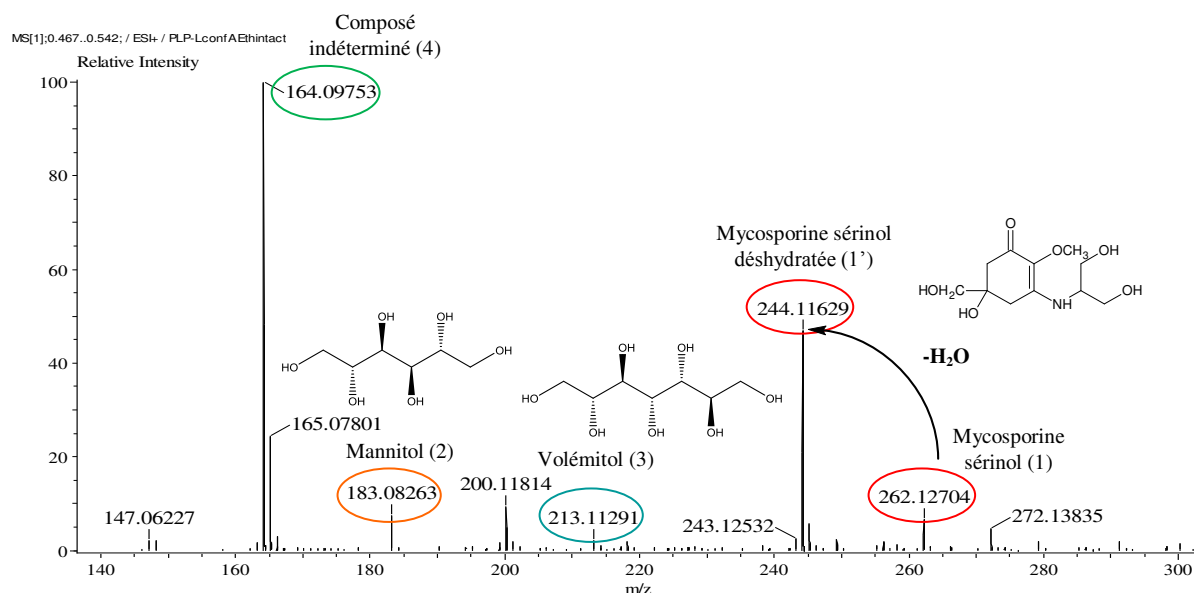
Une analyse chimique de *Lichina confinis* a été menée par Marie De Lasalle (Stagiaire UV Recherche Pharmacie, Université de Rennes 1, 2013) en utilisant une méthode de spectrométrie de masse de type DART (Direct Analysis in Real Time) sur 21 mg de thalle intact et 22 mg de thalle broyé extraits à l'eau ultra-pure pendant 30 min sous ultra-sons et durant une nuit à température ambiante. Les analyses ont été faites par Pierre Le Pogam (Doctorant, UMR CNRS 6226, ISCR, Equipe PNSCM, Université Rennes 1). Les spectres de masse obtenus ( $[M+H]^+$   $m/z$ ) sont présentés ci-dessous (**Figures 31 et 32**).

Au travers de cette étude par DART, 3 composés ont pu ainsi être mis en évidence : mycosporine sérinol ( $C_{11}H_{19}O_6N$ ) (1), mannitol ( $C_6H_{14}O_6$ ) (2) et potentiellement du volémitol ( $C_7H_{16}O_7$ ) (3). Outre ces 3 composés, un métabolite indéterminé de  $[M+H]^+$   $m/z$  164.09753 (4) a été mis en évidence aussi bien au sein du thalle intact que du thalle broyé (**Tableau 7**).



**Figure 31** : Spectres de masse ( $[M+H]^+$   $m/z$ ) du thalle intact (A) et broyé (B) acquis au cours de l'analyse de type DART





**Figure 32** : Zoom du spectre de masse ( $[M+H]^+ m/z$ ) du thalle intact acquis au cours de l'analyse de type DART

**Tableau 7** : Récapitulatif des données obtenues par spectrométrie de masse de type DART

Masse ( $[M+H]^+ m/z$ )	Formule Brutes	Identifications	Localisation	
			Thalles intacts	Thalles broyés
147.06227	$C_2H_7N_6O_2^*$	-	-	+
148.09070	$C_2H_{10}N_7O^*$	-	+	-
164.09753	$C_7H_{10}N_5^*$ ou $C_3H_{10}N_5O_3^*$	-	+	+
183.08263	$C_6H_{14}O_6$	Mannitol	+	+
200.11814	$C_{12}H_{14}N_3^*$	-	+	+
213.11291	$C_7H_{16}O_7^*$	Volémitol	+	-
244.11629	$C_7H_{14}N_7O_3$	Mycosporine sérinol déshydraté	+	+
262.12704	$C_{11}H_{19}N O_6$	Mycosporine sérinol	+	+
272.13835	$C_{15}H_{18}N_3O_2^*$	-	+	-
312.12488	$C_7H_{18}N_7O_7^*$	-	-	+
314.18467	$C_{13}H_{24}N_5O_4^*$	-	+	-
346.17865	$C_7H_{24}N_9O_7^*$	-	+	-
391.28870	$C_{14}H_{35}N_{10}O_3$	Etalon interne (phtalates)	+	+
554.37127	$C_{30}H_{52}NO_8^*$	-	-	+

\* Formules brutes possibles pour les composés non identifiés (simulateur de masse Xcalibur version 2.0.7 avec une tolérance de 0.003 amu maximum)

De plus, aucune différence notable de profil chimique n'a été mise en évidence selon la nature de l'échantillon (intact ou broyé). Par conséquent, il ne semble pas y avoir de localisation spécifique de ces métabolites spécifiques au sein du thalle de *Lichina confinis*. D'autre part, les métabolites mis en évidence par spectrométrie de masse de type DART ne sont pas les mêmes que ceux observés par analyses LC-MS/MS à l'exception de la mycosporine sérinol. Ainsi ni le mannitol ni le volémitol n'ont été détectés par LC-MS. Néanmoins les conditions d'extraction utilisées pour le DART sont plus polaires. Par conséquent, ces deux approches se sont révélées être complémentaires l'une de l'autre dans l'étude de *Lichina confinis*.



## 2.4. Etude chimique de deux espèces du genre *Roccella* sp.

Suite à l'ensemble des résultats obtenus par profilage chimique, les deux espèces du genre *Roccella* ont été choisies pour être étudiées d'un point de vue chimique (isolement, purification et identification structurale) et biologique (propriétés antioxydantes, cytotoxiques et antibactériennes).

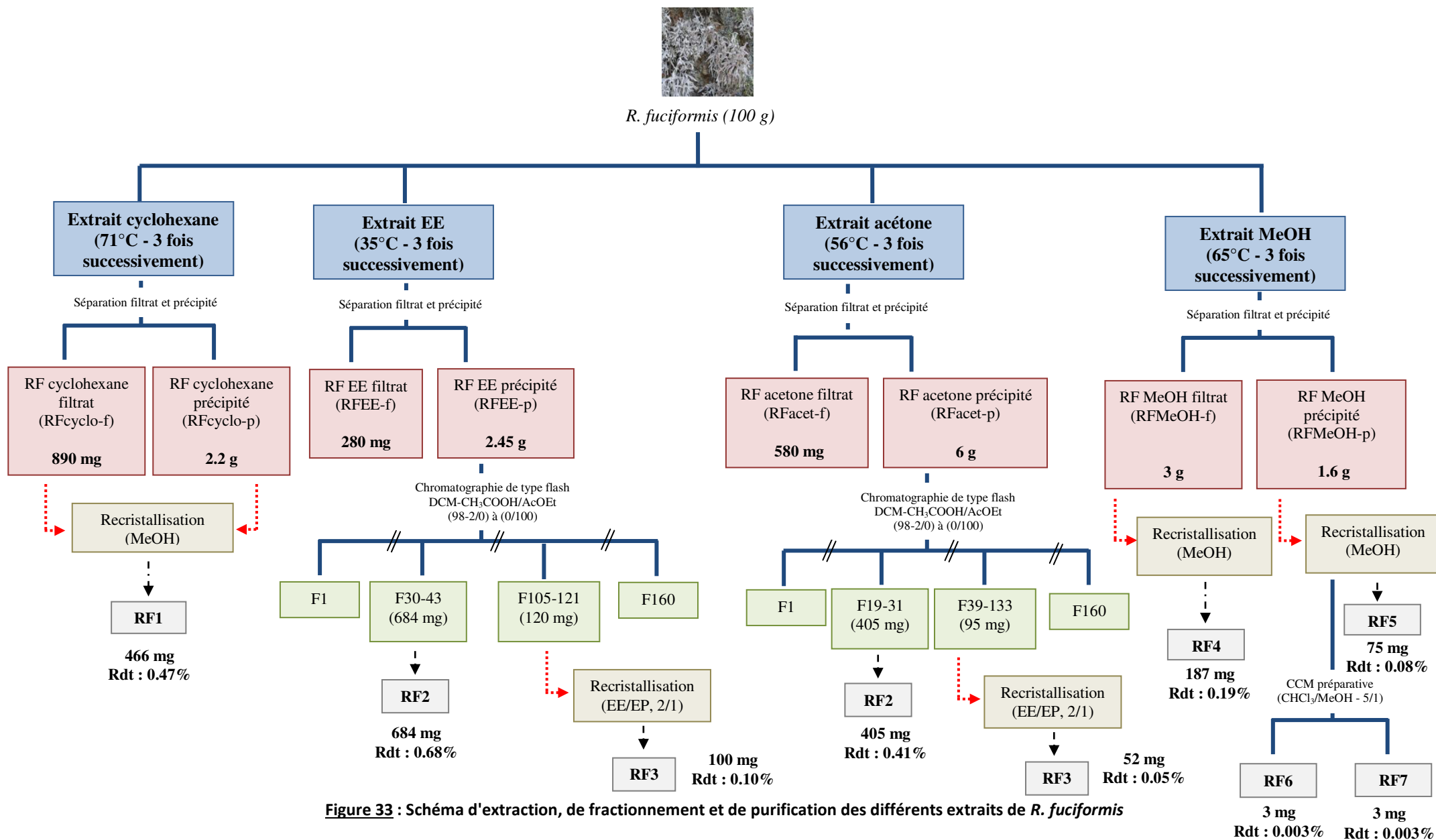
Les échantillons utilisés au cours de cette étude chimique ont été récoltés à la Pointe de la Varde, Saint Malo (Ille et Vilaine, Bretagne, France - 48°41'1.651"N, 1°59'22.995"O) en Janvier 2011 par J. Boustie et D. Parrot et en Septembre 2011 par D. Delmail et S. Tomasi.

### 2.5.1. Etude chimique de *R. fuciformis* : extractions, isolements et identifications structurales

Afin d'isoler et d'identifier les métabolites (majoritaires et si possible les minoritaires) repérés par profilage chimique (cf. 2.2.1.), les échantillons ont été broyés par l'utilisation du broyeur planétaire. La poudre obtenue (100 g et 20 g pour *R. fuciformis* et *R. phycopsis* respectivement) a été extraite 3 fois successivement par différents solvants de polarité croissante (cyclohexane - diéther éthylique - acétone - méthanol) à leur température d'ébullition (71°, 35°, 56°, 65°) afin de réaliser une première séparation des métabolites selon leurs propriétés chimiques (polarité, solubilité) et ainsi faciliter leur isolement et identification.

Différents extraits ont été obtenus et soumis à différentes techniques de séparation et de purification. Dans un premier temps, les précipités formés par évaporation lente du solvant (correspondant généralement aux composés majoritaires de chaque extrait) ont été récupérés et séparés par filtration.

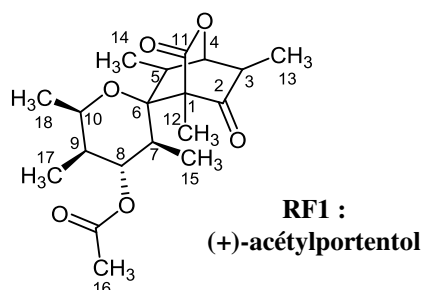
Afin d'isoler les différents composés de *R. fuciformis*, les différents extraits obtenus (précipités et filtrats) ont été analysés. Tout d'abord, les précipités diéther éthylique (EE) et acétone provenant des extraits EE et acétone ont été soumis à des chromatographies de type flash sur gel de silice (SiO<sub>2</sub>, 25 g, Biotage). Des dépôts solides (de 260 mg à 308 mg) ont été effectués. La phase mobile choisie est constituée d'un mélange binaire DCM/CH<sub>3</sub>COOH (98/2) et AcOEt comme décrit dans la partie Matériels & Méthodes ce qui a abouti à l'obtention de 160 fractions chacune de 10 mL et l'isolement de 2 composés (**RF2** et **RF3**). Le précipité de l'extrait MeOH a été en partie traité par la réalisation de CCM préparatives (CHCl<sub>3</sub>/MeOH - 5/1 comme système de migration) afin d'isoler et d'identifier 2 composés minoritaires (**RF6** et **RF7**). L'autre partie de l'extrait MeOH : précipité et filtrat ont été chacun soumis à une recristallisation par du MeOH afin d'obtenir deux composés principaux (**RF4** et **RF5**). L'ensemble de l'extrait cyclohexane (précipité et filtrat) a été soumis à une recristallisation par du MeOH (deux fois successivement) ce qui a permis d'isoler le composé majoritaire de cet extrait (**RF1**). Ainsi, 7 composés ont pu être isolés et identifiés au cours de cette étude chimique de *Roccella fuciformis*. L'ensemble des fractionnements et des purifications est résumé sur la **Figure 33**.

Figure 33 : Schéma d'extraction, de fractionnement et de purification des différents extraits de *R. fuciformis*

La purification de **RFcyclo-p** donc de **RF1** a été faite par une recristallisation de cette fraction par du MeOH (2 fois successivement), ce qui a conduit à l'isolement de 466 mg du composé **RF1** (soit 0.47%) sous forme de cristaux. A partir des données bibliographiques sur *Rocella fuciformis*, ce composé pourrait correspondre à l'acétylportentol. De plus, les informations de masse haute résolution (HRESIMS) donne pour formule brute  $C_{19}H_{27}O_6$  et un ion moléculaire à  $m/z$   $[M+Na]^+$  375,1782 pour le composé **RF1**.

A partir de ces 466 mg du composé **RF1** isolés et purifiés, une étude spectrale par RMN- $^1H$  et  $^{13}C$  (300 et 75 MHz) a été réalisée dans le  $CDCl_3$ . En RMN- $^1H$ , dans la zone de haut champ (entre  $\delta = 0.5$  et  $1.5$  ppm), sept signaux correspondant à des groupements méthyles (3H) sont présents. La plupart de ces signaux sont sous la forme de doublets, ce qui est caractéristique d'un environnement proche d'un méthine. Parmi ces méthyles, certains sont plus déblindés que d'autres. En effet, certains signaux sont dans la zone de  $\delta = 1.2$  et  $1.3$  ppm, ce qui correspond à des méthyles présents dans un environnement proche de groupement de type cétone. De même pour le méthyle à  $\delta = 2.12$  ppm, ce qui dans le cas présent, semble indiquer l'inclusion de ce méthyle dans une fonction acétate. D'autre part, on note également la présence de trois quadruplets intégrant chacun 1H à  $\delta = 2.42$ ,  $2.33$  et  $3.79$  ppm. Deux autres signaux correspondant à 1H chacun sont plus déblindés ( $\delta = 4.42$  et  $5.06$  ppm) et indiquent la possibilité que ces protons soient voisins d'un hétéroatome (l'oxygène par exemple). Enfin, l'absence de signaux dans la zone des aromatiques ( $6 \geq \delta < 9$  ppm) confirme la non absorption des UV par le composé.

Ainsi, en comparant les données de RMN obtenues à celles décrites dans la littérature <sup>72,94</sup>, il en résulte que le composé **RF1** correspond bien à l'acétylportentol et plus particulièrement au (+)-acétylportentol ( $[\alpha]_D$  à  $25^\circ C$   $+40.3\text{ dm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-3}$ ;  $c = 1$ , MeOH ; littérature :  $[\alpha]_D$   $+35\text{ dm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-3}$ ;  $c = 1,01$   $CHCl_3$ )<sup>72</sup> (**Figure 34**, **Tableau 8** et **Annexe 2**).



**Figure 34 : Structure du (+)-acétylportentol (RF1)**

<sup>94</sup>Pettit, G. R., Zhang, Q., Pinilla, V., Herald, D. L., Doubek, D. L., Duke, J. A. (2004) *Journal of Natural Products* 67, 983–985.

**Tableau 8 : Données spectrales RMN (ppm) du (+)-acétylportentol (RF1) dans le CDCl<sub>3</sub> à 300 MHz**

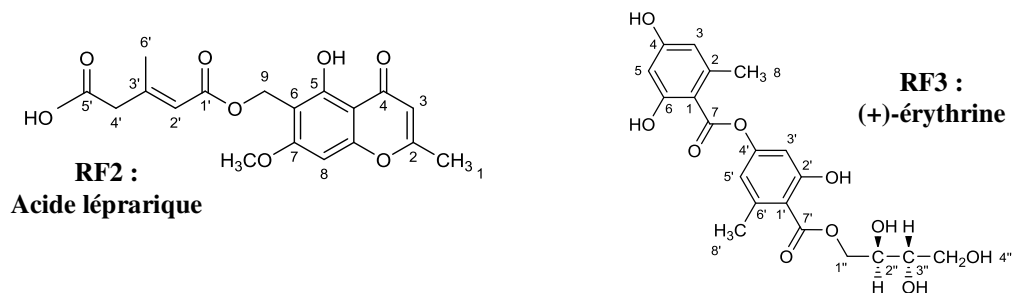
Position	$\delta_c$	$\delta_H$ (J en Hz), (allure)
1	67.7	-
2	207.6	-
3	45.9	2.33 (7.5 ; 6.9) (qd)
4	83.9	4.42 (7.2) (d)
5	37.5	2.42 (6.6) (q)
6	80.3	-
7	38.3	2.01 (7.1 ; 2.5) (qd)
8	75.1	5.06 (2.5) (tapp.)
9	40.2	1.43 (m)
10	71.0	3.79 (m)
11	168.6	-
12	8.6	1.34 (s)
13	14.2	1.23 (7.1) (d)
14	14.8	1.54 (7.1) (d)
15	13.7	0.75 (7.1) (d)
16	20.7	2.12 (s)
17	15.2	0.75 (7.1) (d)
18	19.6	1.11 (6.0) (d)
-COO	170.3	-

Le précipité **RFEE-p** et les fractions 30 à 43 obtenues en début de gradient par chromatographie de type flash lors de l'ajout d'AcOEt ont été regroupées. Après concentration et évaporation de ces fractions, 684 mg (soit 0.68%) du composé **RF2** ont été obtenus. D'autre part, les fractions 105 à 121 obtenues après séparation par chromatographie de type flash par le mélange CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>COOH : AcOEt (60 à 70% d'AcOEt) et évaporation sous vide aboutissent à 120 mg d'une poudre blanche. Cette dernière a été soumise à une recristallisation par un mélange AcOEt/EP (2:1) ce qui a conduit à l'obtention de 100 mg (soit 0.10%) de produit pur **RF3**.

A partir des données bibliographiques et également à partir des informations données par la HRESIMS et les voies de fragmentations proposées (cf. 2.2.1.1.), les composés **RF2** et **RF3** pourraient correspondre respectivement à l'acide léprarique (C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>O<sub>8</sub>, m/z [M+Na]<sup>+</sup> 385.0894) et à l'érythrine (C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>O<sub>10</sub>, m/z [M+Na]<sup>+</sup> 445.1105).

Le spectre RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) (**Annexe 3**) du composé **RF2** présente uniquement des signaux sous la forme de singulets. Parmi ceux là, deux signaux sont localisés dans la zone des protons aromatiques à 6.37 et 6.07 ppm (H8 et H3) intégrant chacun pour 1H, ce qui correspond aux 2H aromatiques. Trois singulets (intégrant chacun pour 3H) correspondent à 3 groupes méthyles à 2.26, 2.36 et 3.86 ppm. Ce dernier étant plus déblindé que les deux autres, cela suppose sa localisation dans un environnement proche d'un hétéroatome, et correspondrait à la fonction méthoxylique (OCH<sub>3</sub>) portée par le C7. Deux signaux à 5.25 et 3.14 ppm intègrent pour 2H et correspondent à deux groupements méthylènes. D'après les déplacements chimiques, l'un d'entre eux (3.14 ppm) est localisé au voisinage d'une fonction acide (CH<sub>2</sub>-4') alors que l'autre (5.25 ppm) étant plus déblindé correspond à un méthylène voisin d'un hétéroatome (CH<sub>2</sub>-9). Ainsi, ces données en comparaison à celles disponibles dans la littérature<sup>72</sup> permettent de confirmer que le composé RF2 est l'acide léprarique (**Figure 35, Tableau 9**).

Le spectre RMN- $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) (**Annexe 4**) du composé **RF3**, présente deux singulets à 2.29 et 2.34 ppm intégrant chacun pour 3H. Leurs déplacements chimiques en  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  permettent de les assimiler à des fonctions méthyles portées par des carbones quaternaires aromatiques (C6 et C6'). Deux signaux sont observés dans la zone des protons aromatiques à 6.22 et 6.60 ( $J = 3.30$  Hz) ppm. Ces derniers intègrent chacun pour 2H, cela impliquant la présence de 4H aromatiques présentant deux à deux un environnement chimique identique (H5 et H3 ainsi que H3' et H5'). Des signaux dans la zone de déplacement chimique entre 3 et 5 ppm sont également observés. On distingue un quadruplet, un doublet et 3 singulets. Ces signaux font référence aux déplacements chimiques de protons d'un polyol. En comparaison avec les données bibliographiques<sup>72</sup>, on a pu confirmer l'identification du composé **RF3** comme étant l'érythrine et plus particulièrement la (+)-érythrine ( $[\alpha]_D$  à 25°C +3.0  $\text{dm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-3}$ ;  $c = 1$ , DMSO ; littérature : +8.0  $\text{dm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-3}$ )<sup>72</sup> (**Figure 35, Tableau 9**).



**Figure 35 :** Structures de l'acide léprarique (RF2) et de la (+)-érythrine (RF3)

**Tableau 9 :** Données spectrales RMN (ppm) de l'acide léprarique (RF2) ( $\text{CDCl}_3$ ) à 300 MHz et de l'érythrine (RF3) (DMSO- $d_6$ ) à 500 MHz

Acide léprarique (RF2)			(+) Erythrine (RF3)		
Position	$\delta_C$	$\delta_H$ (J en Hz) (allure)	Position	$\delta_C$	$\delta_H$ (J en Hz) (allure)
1	18.9	2.26 (1.1) (d)	1	107.4	-
2	166.1	-	2	140.4	-
3	106.7	5.80 (1.1) (q)	3	100.7	6.22 (2.3) (d)
4	182.4	-	4	161.3	-
4a	105.0	-	5	110.0	6.60 (3.6) (d)
5	160.8	-	6	160.2	-
6	109.1	-	7	167.4	-
7	164.1	-	8	21.5	2.29 (s)
8	89.6	6.37 (s)	1'	114.5	-
8a	158.5	-	2'	152.0	-
9	54.3	5.25 (s)	3'	108.6	6.60 (3.6) (d)
OMe	56.1	3.89 (s)	4'	156.8	-
1'	166.8	-	5'	118.5	6.22 (2.3) (d)
2'	120.1	6.07 (sl)	6'	138.7	-
3'	149.9	-	7'	168.1	-
4'	45.2	3.14 (s)	8'	20.1	2.34 (s)
5'	174.6	-	1''	67.3	3.54 (m)
6'	20.5	2.36 (s)	2''	69.5	4.20 (m)
OH	-	13.02 (s)	3''	72.8	3.68 (sl)
			4''	63.5	4.34 (sl)
			2''-OH	-	4.97 (5.4) (d)
			3''-OH	-	4.74 (sl)
			4-OH	-	10.32 (s)
			6-OH	-	10.36 (s)
			6'-OH	-	10.03 (s)

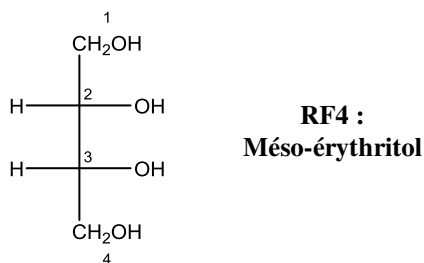
Le précipité de l'extrait acétone (**RFacet-p**) et plus particulièrement les fractions 19-31 et 39-133 obtenues à l'issue de la chromatographie de type flash ont permis d'isoler et d'identifier 2 composés : **RF2** (405 mg, soit 0.41%) et **RF3** (52 mg, soit 0.05%). Les composés **RF2** et **RF3** correspondent à nouveau à l'acide léprarique ( $C_{18}H_{18}O_8$ ,  $m/z$   $[M+Na]^+$  385.0899) et à l'érythrine ( $C_{20}H_{22}O_{10}$ ,  $m/z$   $[M+Na]^+$  445.1108) respectivement. Ainsi, 1.07 g (soit 1.1%) de **RF2** et 205 mg (soit 0.21%) de **RF3** ont été isolés de *Rocella fuciformis*.

A partir des extraits MeOH (précipité et filtrat), 1.58 g de précipité (**RFMeOH-p**) formé par refroidissement et évaporation lente du solvant ont été récupérés et 3.0 mg de filtrat (**RFMeOH-f**).

L'extrait **RFMeOH-f** a été soumis à une recristallisation par du MeOH, ce qui a permis d'obtenir 187 mg (soit 0.19%) de produit pur du composé **RF4** sous la forme de cristaux. Ce composé est non aromatique (non visible aux UV) et réagissant uniquement sur CCM au thymol sulfurique (révélateur des sucres/polyols).

A partir des informations données par les analyses de HRESIMS et les données bibliographiques, le composé **RF4** correspondrait à un polyol : le méso-érythritol de formule brute :  $C_4H_{10}O_4$ ,  $m/z$   $[M+Na]^+$  145.0474.

De plus, le spectre RMN- $^1H$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) (**Annexe 5**) du composé **RF4** montre uniquement des signaux blindés (zone des signaux non aromatiques) indiquant qu'il s'agit d'une molécule non aromatique. Ceci était conforme aux observations précédemment décrites. En RMN- $^1H$ , l'ensemble des protons est situé entre 3.25 et 4.60 ppm sous la forme de multiplets, indiquant la présence de protons carbinoliques. Les différentes informations structurales ainsi que les données bibliographiques<sup>72</sup> confirment le composé **RF4** comme étant le méso-érythritol (**Figure 36**, **Tableau 10**).



**Figure 36** : Structure du méso-érythritol (**RF4**)

**Tableau 10** : Données spectrales RMN (ppm) du méso-érythritol dans le DMSO- $d_6$  à 500 MHz

Position	Nb de Protons	$\delta_c$	$\delta_H$ (ppm) (J en Hz) (allure)
<u>CH</u> <sub>2</sub> OH	4H	72.6	4.33 (m)
<u>CH</u> -OH	2H	63.4	3.51-3.56 (m)
<u>OH</u>	2H	-	4.47 (m)

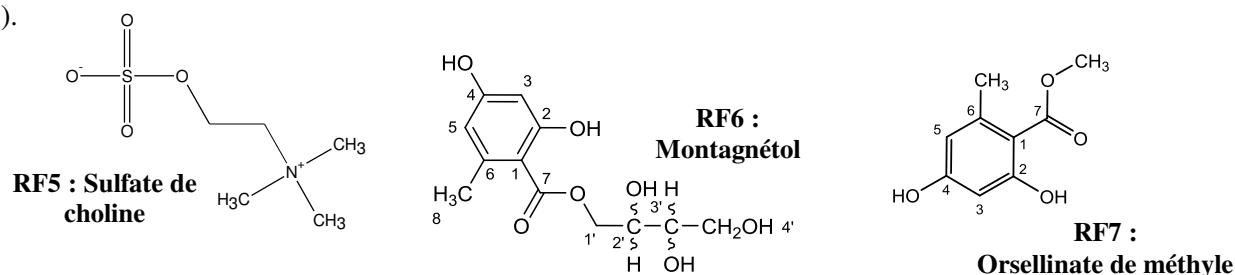
La purification de **RFMeOH-p** a été faite de deux manières : une recristallisation par du MeOH a été effectuée et à partir du filtrat, 4 CCM préparatives ont été réalisées avec comme éluant  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (5/1). Ceci a permis d'obtenir le composé majoritaire (**RF5**, 75 mg, soit 0.075%) ainsi que deux composés minoritaires : **RF6** (3 mg, soit 0.003%) et **RF7** (3 mg, soit 0.003%).

Le composé **RF5** est un métabolite non aromatique (non visible sous UV), ne réagissant avec aucun des révélateurs testés (anysaldéhyde sulfurique (ANS), thymol sulfurique et ninhydrine) après migration sur CCM. Cependant, les données de HRESIMS ont permis d'accéder à sa formule brute :  $\text{C}_5\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S}$ ,  $m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  206.0466 et d'orienter une hypothèse structurale sur un composé de type sulfate et plus particulièrement d'après les données bibliographiques<sup>71</sup>, il s'agirait de choline sulfate (**Figure 37**). Les deux composés minoritaires (**RF6** & **RF7**) sont des métabolites aromatiques (visibles sous UV à 254 nm) et donnant tous les deux une couleur rouge à l'ANS après migration sur CCM ( $R_f$  0.03 et 0.8). A l'aide des données LC-MS et HRESIMS et des données bibliographiques disponibles, les composés **RF6** et **RF7** correspondraient respectivement au (+)-montagnétol ( $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_7$ ,  $m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  295.0793) et à l'orsellinate de méthyle ( $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_4$ ,  $m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  205.0479).

Afin de confirmer ces hypothèses, des analyses structurales par RMN ( $^1\text{H}$ , acétone- $d_4$ , 500 MHz) ont été réalisées pour chacun de ces deux composés (**RF6** et **RF7**).

Pour **RF6**, les signaux observés montrent tout d'abord la présence de 2H aromatiques (6.30 et 6.25 ppm), d'un  $\text{CH}_3$  porté par un aromatique (2.50 ppm) ainsi que les signaux d'un polyol dans la zone de bas déplacements chimiques. Ceci indique qu'il s'agit d'un métabolite aromatique substitué par un polyol correspondant bien au montagnétol par comparaison aux données de RMN- $^1\text{H}$  disponibles.<sup>72</sup> Cependant, par un manque de quantité, la configuration absolue du montagnétol n'a pas pu être déterminée.

En ce qui concerne le composé **RF7**, les données de RMN- $^1\text{H}$  montrent presque exclusivement des signaux dans les zones des protons aromatiques. En effet, deux signaux correspondent à 2H aromatiques (6.24 et 6.29 ppm ; H1 et H3), deux signaux à des OH-aromatiques (9.2 et 11.62 ppm), 1 signal à 2.46 ppm indiquant la présence d'un  $\text{CH}_3$  aromatique ( $\text{CH}_3$ -8) et un signal à 4 ppm correspond à un groupement méthylcarboxylique ( $\text{COOCH}_3$ -7). Ainsi, l'ensemble des données physico-chimiques obtenues et en comparaison aux données bibliographiques<sup>72</sup> ont permis d'affirmer la présence de l'orsellinate de méthyle (**RF7**) au sein du lichen *R. fuciformis* (**Figure 37**, **Tableau 11**, **Annexes 6 et 7**).



**Figure 37 : A. Structure de la choline sulfate (RF5), du montagnétol (RF6) et de l'orsellinate de méthyle (RF7)**

**Tableau 11** : Données spectrales RMN (ppm) du montagnétol (RF6) (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) et de l'orsellinate de méthyle (RF7) (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) à 300 MHz

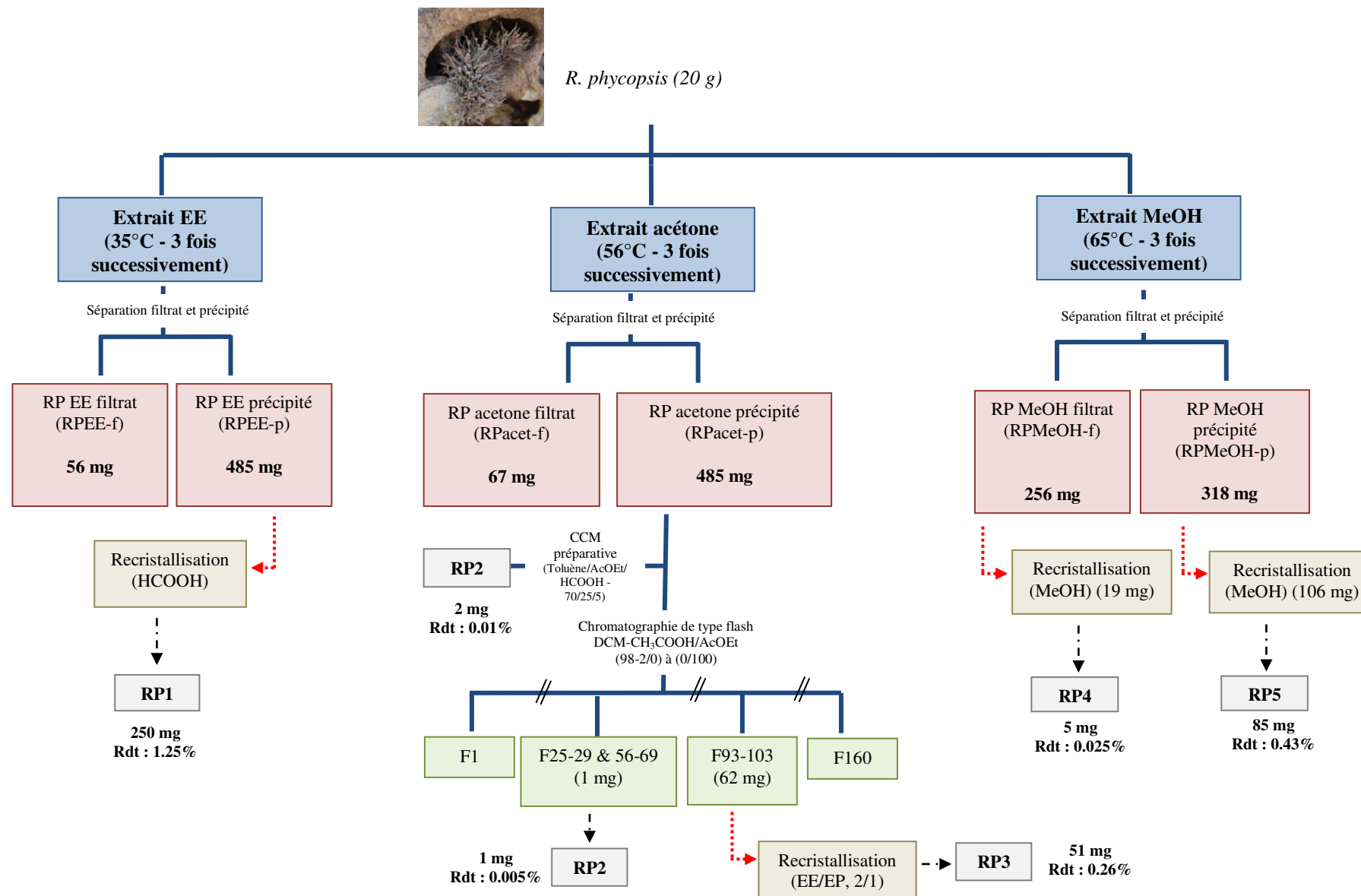
Montagnétol (RF6)		Orsellinate de méthyle (RF7)	
Position	δ <sub>H</sub> (J en Hz) (allure)	Position	δ <sub>H</sub> (allure)
<b>1</b>	-	<b>1-COOCH<sub>3</sub></b>	3.92 (s)
<b>2-OH</b>	9.09 (s)	<b>2-OH</b>	9.17 (sl)
<b>3</b>	6.25 (2.5) (d)	<b>3</b>	6.24 (s)
<b>4-OH</b>	11.60 (s)	<b>4-OH</b>	11.62 (s)
<b>5</b>	6.30 (2.5 ; 0.7) (qd)	<b>5</b>	6.29 (s)
<b>6</b>	-	<b>6-CH<sub>3</sub></b>	2.46 (s)
<b>7</b>	-		
<b>8</b>	2.55 (s)		
<b>1'</b>	3.71 (m)		
<b>2'</b>	4.00 (m)		
<b>3'</b>	3.80 (m)		
<b>4'</b>	4.29 (5.3) (d)		
<b>2'-OH</b>	4.61 (11.5 ; 2.8) (dd)		
<b>3'-OH</b>	4.61 (11.5 ; 6.4) (dd)		

### 2.5.2. Etude chimique de *R. phycopsis* : extractions, isolements et identifications structurales

Afin d'isoler les différents composés de *R. phycopsis*, les différents extraits obtenus (précipités et filtrats) ont été analysés. Tout d'abord, le précipité acétone provenant de l'extrait acétone a été soumis à une chromatographie de type flash sur gel de silice (SiO<sub>2</sub>, 25 g, Biotage). Un dépôt solide de 400 mg a été effectué. La phase mobile choisie est constituée d'un mélange binaire DCM/CH<sub>3</sub>COOH (98/2) et AcOEt comme décrit dans la partie Matériels & Méthodes ce qui a abouti à l'obtention de 160 fractions chacune de 10 mL et l'isolement de 2 composés (**RP2** et **RP3**). A partir de ce même précipité (**RPacet-p**), 3 CCM préparatives ont été réalisées à l'aide du système de solvant EE/EP/HCOOH (70/25/5) afin d'augmenter les quantités isolées du composé **RP2**. Le précipité EE provenant de l'extrait EE a été soumis à une recristallisation par du HCOOH suivi par un lavage au cyclohexane (azéotrope du HCOOH) afin d'isoler le composé **RP1**. Le précipité comme le filtrat de l'extrait MeOH ont été soumis à une recristallisation par du MeOH. Ceci a permis d'isoler le composé **RP4** du filtrat et le composé **RP5** du précipité de l'extrait MeOH.

Ainsi, 5 composés ont pu être isolés et identifiés au cours de cette étude chimique de *Rocella phycopsis*. L'ensemble des fractionnements et des purifications est résumé sur la **Figure 38**.

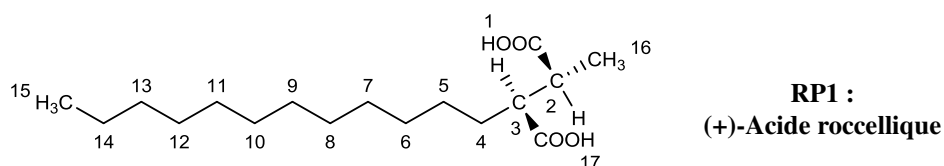




**Figure 38 :** Schéma d'isolement, de fractionnement et de purification des différents extraits de *R. phycopsis*

La purification de **RPEE-p** (485 mg) par une recristallisation de cette fraction par de l'acide acétique glacial (2 fois successivement) puis par l'évaporation sous vide de cet acide par l'utilisation du cyclohexane a conduit à l'isolement de 250 mg (soit 1.25%) du composé **RP1**.

Le composé majoritaire de ce précipité (**RP1**) est un métabolite non aromatique (non visible sous UV à 254, 312 ou 365 nm). A l'aide des données LC/MS, HRESIMS et des données bibliographiques disponibles <sup>72</sup>, le composé **RP1** correspondrait à l'acide roccellique ( $C_{17}H_{32}O_4$ ,  $m/z$   $[M+Na]^+$  323.2198). Les spectres de RMN ( $^1H$  (500 MHz) et  $^{13}C$  (125 MHz)) réalisés dans du  $CD_3OD$  montrent la présence de signaux caractéristiques d'un diacide à longue chaîne aliphatique. En effet, les signaux à 175.43 et 176.20 ppm correspondent à des carbones d'une fonction acide ( $\underline{C}OOH$ -17 et  $\underline{C}OOH$ -1). Ceux visibles à 0.90 et 1.17 ppm ( $^1H$ -RMN) font référence à deux groupements méthyles aliphatiques ( $\underline{CH}_3$ -16 et  $\underline{CH}_3$ -15). Les signaux à 1.43 et 1.60 ppm ( $^1H$ -RMN) correspondent à des protons portés par des carbones de type méthine (H-2 et H-3). Enfin, la présence d'une chaîne aliphatique est caractérisée par des signaux compris entre 1.23 et 1.33 ppm ( $^1H$ -RMN) dont l'intégration totale correspond à 22H ( $CH_2$ -4 à  $CH_2$ -14) (**Figure 39** et **Tableau 12**, **Annexe 8**). Ces données sont comparables à celles décrites dans la littérature <sup>72</sup> et donc confirme bien la détermination du composé **RP1** comme étant l'acide roccellique et plus particulièrement au (+)-acide roccellique ( $[\alpha]_D$  à 25°C +11  $dm^{-1}.g^{-1}.cm^{-3}$ ;  $c = 1$ , THF ; littérature  $[\alpha]_D$  +18  $dm^{-1}.g^{-1}.cm^{-3}$ ;  $c = 1.94$ , EtOH). <sup>37</sup>



**Figure 39** : Structure de l'acide roccellique (**RP1**)

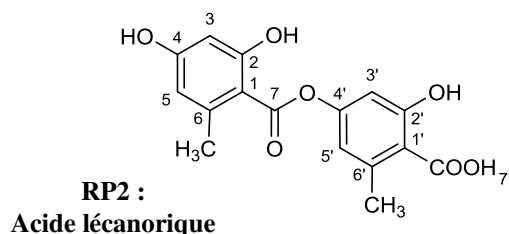
**Tableau 12** : Données spectrales RMN (ppm) de l'acide roccellique (**RP1**) dans  $CD_3OD$  à 500 MHz

Position	$\delta_c$	$\delta_H$ (J en Hz) (allure)
1- $\underline{C}OOH$	175.45	-
2	42.68	1.43 (m)
3- $\underline{C}OOH$	176.20	-
3	49.27	1.60 (m)
4-14	23.40-32.71	1.23-1.33 (m)
15	14.43	0.90 (6.8) (t)
16	15.82	1.17 (6.1) (d)

Les fractions 25-29 et 56-69 obtenues en début de gradient de la chromatographie de type flash du précipité **RPacet-p** (485 mg) ont été regroupées et évaporées sous vide. Suite à la réalisation de CCM préparatives (Toluène/AcOEt/HCOOH) ( $R_f$  0.2) à partir également de **RPacet-p**, ceci a permis d'obtenir au total 3 mg (soit 0.015%) de **RP2**. Les fractions 93 à 103 obtenues avec le solvant  $CH_2Cl_2/CH_3COOH$  : AcOEt (60 à 70% d'AcOEt) ont été regroupées. Après concentration sous vide,

recristallisation (AcOEt/EP ; 2/1) et évaporation de ces fractions, 51 mg (soit 0.26%) de produit pur **RP3** ont été obtenus.

Les analyses structurales effectuées à partir des données de RMN, LC-MS et HRESIMS, ont montré et confirmé qu'il s'agissait pour le composé **RP3** de l'érythrine. En effet, les données sont 100% identiques à celles obtenues pour ce même composé lors de l'étude de *R. fuciformis* (**RF3**). En ce qui concerne le composé **RP2**, les données HRESIMS ( $C_{16}H_{14}O_7$ ,  $[M-H]^-$   $m/z$  317.0666) et bibliographiques orienterait l'identification sur une depside : l'acide lécanorique. Afin de confirmer cette hypothèse, une analyse de RMN- $^1H$  (acétone- $d_6$ , 300 MHz) a été effectuée à partir des 3 mg isolés. Le spectre de RMN- $^1H$  montre 4 signaux dans la zone des protons aromatiques (6.22, 6.29, 6.47 et 6.65 ppm) intégrant normalement chacun pour 1H (présence d'une hydrolyse partielle engendrant une intégration incorrecte pour deux d'entre-eux : 6.22 et 6.29 ppm) indiquant ainsi la présence de 4H aryliques. Deux autres signaux sont situés à 2.19 et 2.40 ppm intégrant chacun pour 3H et correspondant à 2  $CH_3$  aromatiques. Enfin, des signaux déblindés ont également été observés : un seul est présent dans la zone des 10-12 ppm (1H d'une fonction carboxylique) ainsi que la présence d'un signal à 8.96 ppm indiquant un groupement phénolique. D'après ces résultats et les données structurales<sup>72</sup>, le composé **RP2** est bien l'acide lécanorique (**Figure 40** et **Tableau 13**, **Annexe 9**).



**Figure 40** : Structure de l'acide lécanorique (**RP2**)

**Tableau 13** : Données spectrales RMN (ppm) de l'acide lécanorique (**RP2**) dans le  $(CD_3)_2CO$  à 300 MHz

Position	$\delta_H$ (J en Hz) (allure)
2-OH	-
3	6.22 (2.2) (d)
4-OH	8.96
5	6.47 (2.2) (d)
6- $CH_3$	2.19 (s)
2'-OH	-
3'	6.29 (1.8) (d)
5'	6.65 (1.8) (d)
6'- $CH_3$	2.40 (s)
7'-COOH	12.12 (s)

A partir de l'extrait MeOH (précipité et filtrat) (122 mg), 106 mg de précipité (**RPMcOH-p**) formé par refroidissement et évaporation lente du solvant ont été récupérés et 16 mg de filtrat (**RPMcOH-f**).

Le filtrat de l'extrait MeOH (**RPMeOH-f**) (16 mg) a été soumis à une recristallisation par du MeOH, ce qui a permis d'obtenir 5 mg (soit 0.025%) de **RP4**. Les analyses structurales (HRESIMS et RMN) se sont montrées identiques à celles obtenues pour le composé **RF4** de *R. fuciformis*. Par conséquent, le composé **RP4** de *R. phycopsis* correspond également au méso-érythritol.

La purification de **RPMeOH-p** suite à une recristallisation par du MeOH a permis d'obtenir 85 mg (soit 0.43%) du composé **RP5**. Ce composé s'est également montré comme étant identique au composé **RF5** suite aux analyses structurales (HRESIMS). Par conséquent, le composé **RP5** correspond lui aussi hypothétiquement au sulfate de choline.

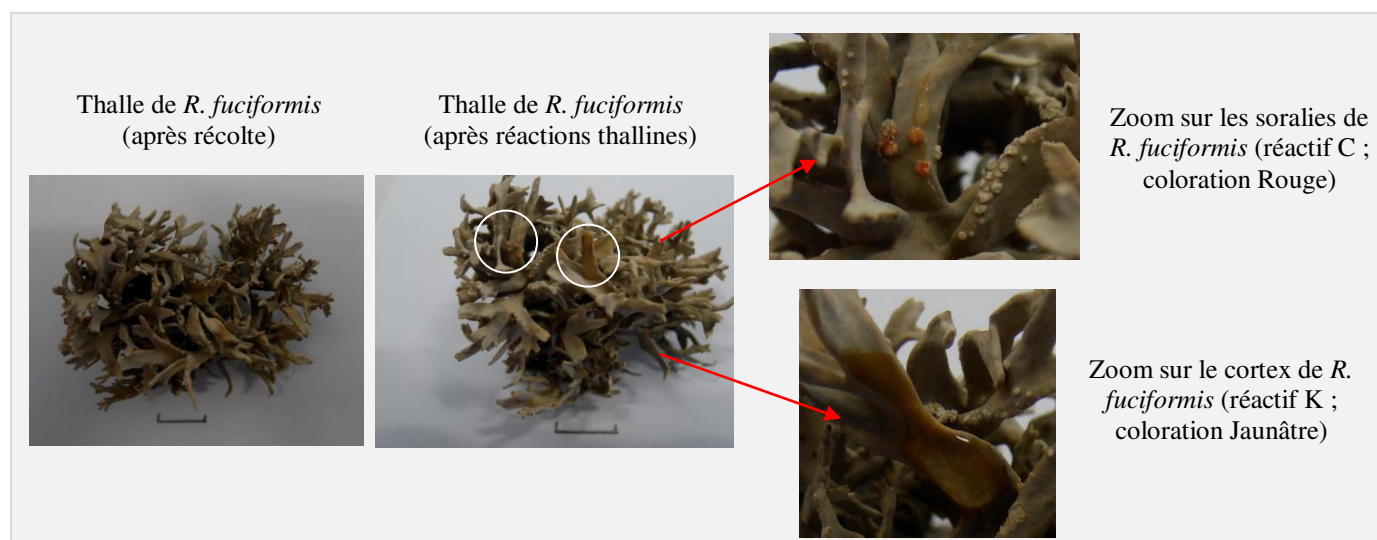
## 2.5. Localisation des composés lichéniques au sein du lichen

Pour identifier ces deux espèces lichéniques l'une de l'autre, outre les caractéristiques morpho-anatomiques, des réactions thallines sont décrites et utilisées<sup>41</sup>. Ces dernières consistent à déposer sur une ou des parties spécifiques du thalle lichénique (cortex, zone médullaire et/ou organes spécifiques : soralies, apothécies ...) un ou des réactifs chimiques. Ceci conduit à une réaction chimique engendrant, selon les métabolites produits par les lichens, la formation d'une coloration sur les différentes parties du thalle lichénique considérées.

Communément, trois réactifs chimiques sont utilisés seuls et/ou en association : l'hypochlorite de sodium (réactif C), la potasse alcoolique à 10% (réactif K) et la *para*-phénylènediamine (réactif P).

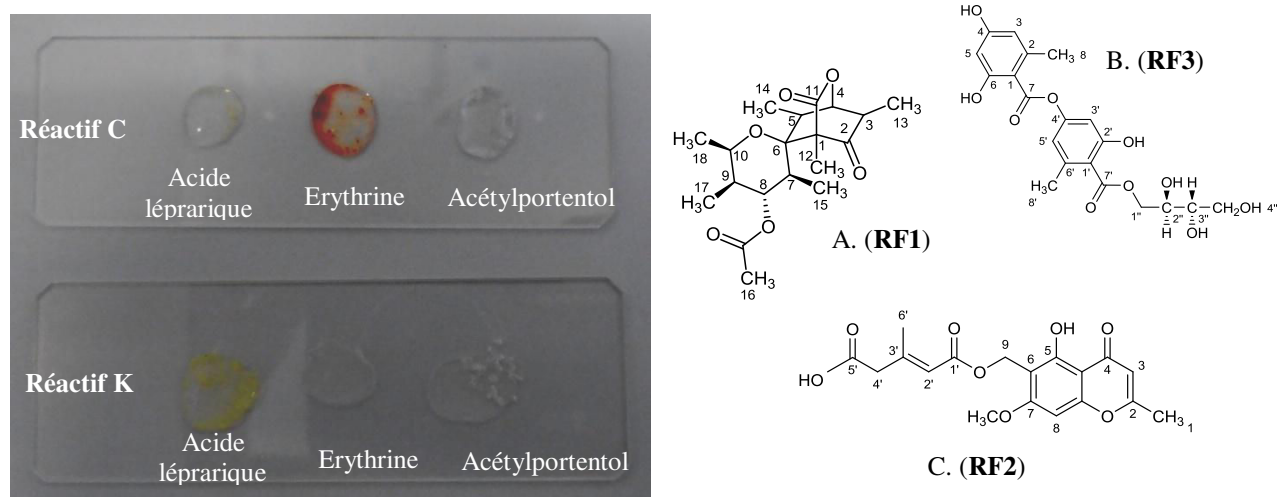
### 2.5.1. Cas du lichen *R. fuciformis*

Pour cette espèce lichénique, les soralies donnent une coloration rouge sous l'action de l'hypochlorite de sodium (réactif C) alors que le cortex donne lui une coloration jaunâtre sous l'action du réactif de potasse alcoolique à 10% (réactif K)<sup>41</sup>. Ainsi, *R. fuciformis* est communément décrit comme étant C+(R) au niveau des soralies et K+(J) au niveau de la zone corticale (**Figure 41**).



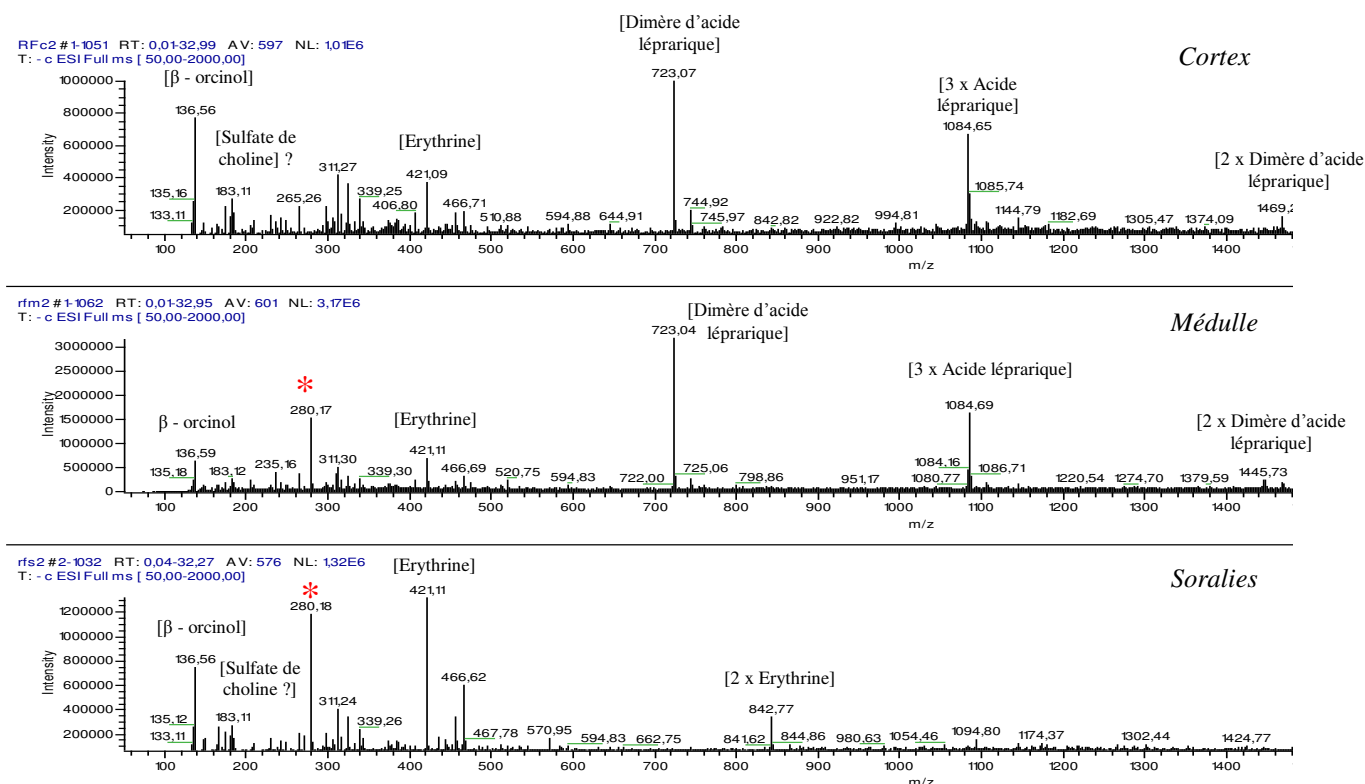
**Figure 41** : Photographies de *R. fuciformis* avant et après réactions thallines (échelle : 1 cm)

Suite à l'étude chimique, différents métabolites ont été isolés et/ou identifiés. Parmi ces derniers, l'acide léprarique (soit 1.1%), l'érythrine (soit 0.2%), l'érythritol (soit 0.2%) et l'acétylportentol (soit 0.5%) se sont révélés être majoritaires au sein de cette espèce. Afin d'avoir une première idée sur le ou les composés responsables de la coloration sous l'action des réactifs, les différents métabolites spécifiques majoritaires (érythrine, acide léprarique et acétylportentol) ont été soumis aux tests thallins. Il en résulte que l'érythrine donne une coloration rouge sous l'action du réactif C, l'acide léprarique, une coloration jaunâtre avec le réactif K et l'acétylportentol ne donne aucune coloration sous l'action de l'un ou de l'autre de ces deux réactifs (**Figure 42**).



**Figure 42** : Tests des réactifs thallins (réactifs C et K) sur les composés spécifiques majoritaires de *R. fuciformis* et structures chimiques de ces métabolites (A. (+)-acétylportentol, B. (+)-érythrine et C. acide léprarique)

Ainsi, à partir de ces premières observations, deux hypothèses ont pu être émises : (1) l'érythrine semble être localisée au niveau des soralies et (2) l'acide léprarique au niveau du cortex. Il en résulterait donc une localisation spécifique des métabolites spécifiques au sein du thalle lichénique. Afin de confirmer ces hypothèses et avoir des profils chimiques plus complets, des extractions de chacune des parties du thalle lichénique (soralies, cortex et médulle) ont été réalisées à l'acétone puis au MeOH (meilleur système de solvant mis en évidence lors du plan d'expérience) et des profils en LC/MS et en CCM ont été réalisés. Les spectres de masses obtenus sont illustrés par la **Figure 43**.



**Figure 43 : Spectres de masse ( $[M-H]^-$   $m/z$ , mode négatif) des différentes parties du thalle lichénique (Cortex, Médulle et Soralies) de *R. fuciformis***

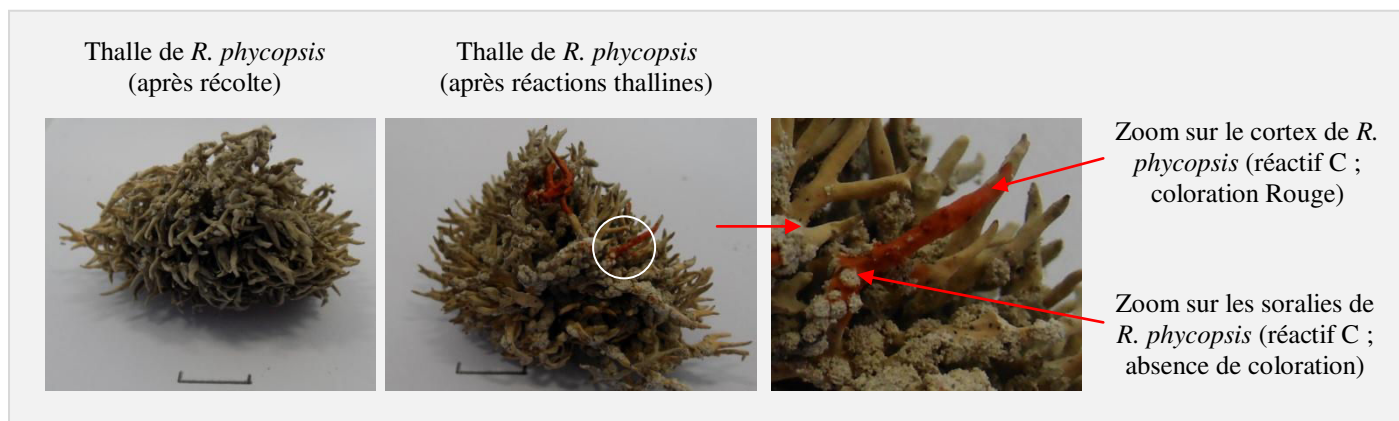
Suite à ces profils, il en résulte une compartimentation spécifique des composés majoritaires de *R. fuciformis* et les hypothèses émises lors des tests avec les réactifs thallins on été confirmés et complétés par les profils chimiques obtenus. Ainsi, l'érythrine est localisée principalement au niveau des soralies, l'acide léprarique et l'acétylportentol (visible uniquement sur les profils CCM, profils non montrés) au niveau du cortex et de la médulle. De plus, un nouveau composé de masse molaire  $281 \text{ g.mol}^{-1}$  (\*) a été ainsi mis en évidence au niveau des soralies et de la zone médullaire.

### 2.5.2. Cas du lichen *R. phycopsis*

Au contraire de *R. fuciformis*, les soralies de *R. phycopsis* peuvent selon les cas donner une coloration rougeâtre ou incolore avec le réactif C et le cortex vire au rouge sous l'action de ce même réactif. Ainsi, *R. phycopsis* est caractérisé par la réaction thalline suivante : C+(R) au niveau du cortex et accessoirement par C+(R) au niveau des soralies<sup>41</sup> (**Figure 44**). La réaction C+(R) au niveau des soralies est probablement dépendante de différents facteurs environnementaux mais également de la production des métabolites spécifiques localisés au niveau de cette zone.<sup>95</sup>

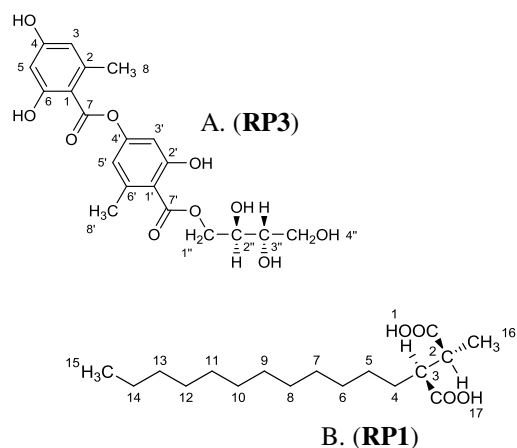
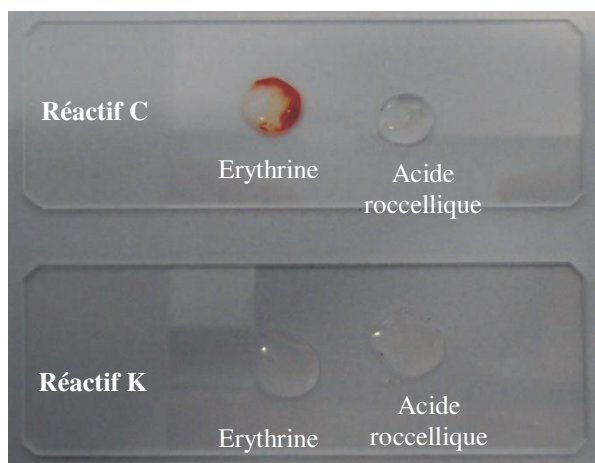
<sup>95</sup>Geiger, M. (2009) Mise au point d'une démarche de profilage des métabolites primaires et secondaires du lichen *Rocella fuciformis*. Application à l'étude du métabolisme en réponse à différentes conditions environnementales, Université de Rennes 1, p. 19.





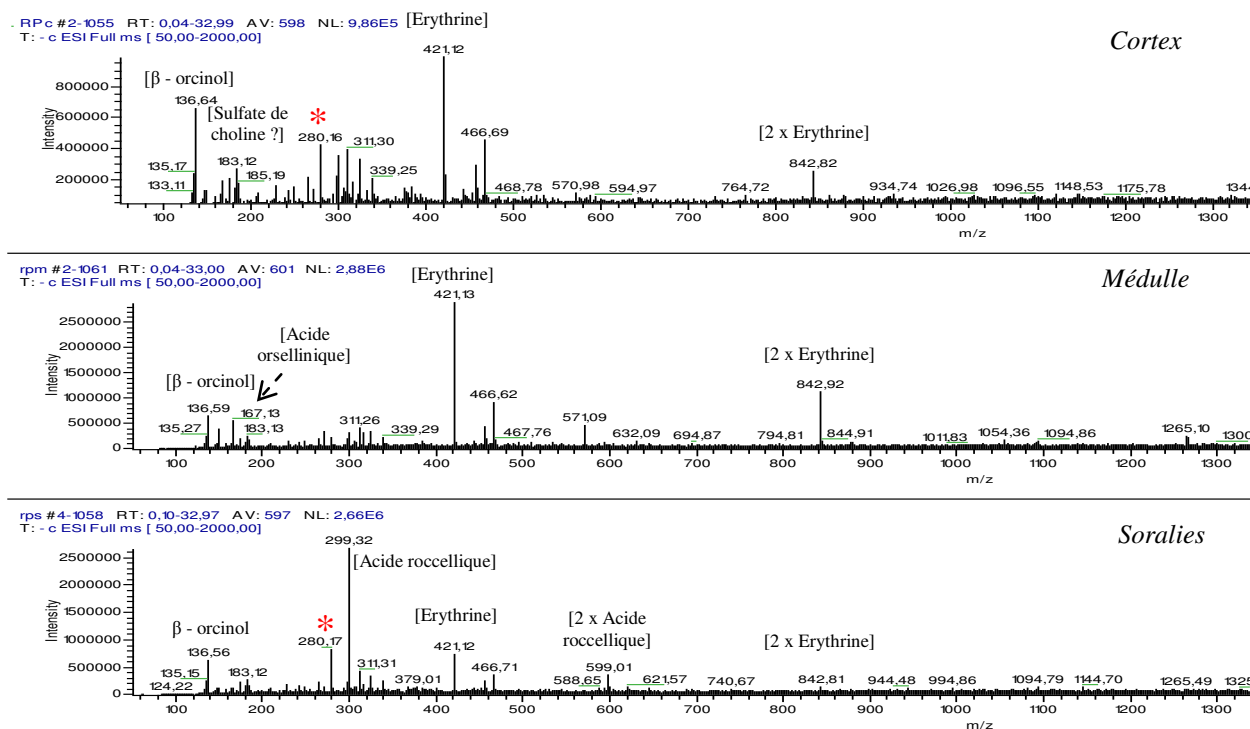
**Figure 44** : Photographies de *R. phycopsis* avant et après réactions thallines (échelle : 1 cm)

Suite à l'étude chimique de cette espèce lichénique, différents métabolites ont été isolés et/ou identifiés. Parmi ces derniers, l'érythrine (soit 0.30%), l'érythritol (soit 0.03%) et l'acide roccellique (soit 1.30%) se sont révélés être majoritaires au sein de cette espèce. Afin d'avoir une première idée sur le ou les composés responsables de la coloration sous l'action des réactifs, ces différents composés majoritaires ont été soumis aux tests thallins, de la même manière que pour ceux de *R. fuciformis*. Il en résulte que l'acide roccellique ne donne aucune coloration sous l'action de l'un ou de l'autre de ces deux réactifs (C et K) (**Figure 45**).



**Figure 45** : Tests des réactifs thallins (réactifs C et K) sur les composés spécifiques majoritaires de *R. phycopsis* et structures chimiques de ces métabolites (A. (+)-érythrine et B. (+)- acide roccellique)

A l'issu de ces expériences, il en résulterait une localisation plus spécifique de l'érythrine au niveau du cortex. Concernant la localisation de l'acide roccellique à l'aide des tests thallins, sa localisation reste énigmatique au sein du thalle lichénique. Afin de confirmer ces localisations, des extractions de chacune des parties du thalle lichénique (sorales, cortex et médulle) de la même manière que pour *R. fuciformis* ont été réalisées et des profils en LC/MS et en CCM (données non présentées) ont été réalisés. Les spectres de masse sont présentés **Figure 46**.



**Figure 46 : Spectres de masse ( $[M-H]^-$   $m/z$ , mode négatif) des différentes parties du thalle lichénique (Cortex, Médulle et Soralies) de *R. phycopsis***

Suite à ces profils, il en résulte également une compartimentation spécifique des composés majoritaires de *R. phycopsis*. Ainsi, l'érythrine est localisée majoritairement au niveau du cortex et de la médulle, alors que l'acide roccellique est le composé majoritaire des soralies. De même que pour *R. fuciformis*, le métabolite de rapport  $[M-H]^-$   $m/z$  280 (\*) est également observé au sein de cette espèce. Mais, sa localisation n'est pas réduite à des zones spécifiques et particulières du thalle lichénique. En effet, il a été observé aussi bien au niveau des soralies, de la médulle que du cortex.

En conclusion, l'érythrine, le métabolite spécifique commun aux deux espèces lichéniques possède une localisation différente au sein de ces deux espèces. En effet, dans le cas de *R. fuciformis*, ce métabolite est localisé au sein des soralies alors que pour *R. phycopsis*, ce dernier est localisé aussi bien au niveau du cortex que de la zone médullaire. Par conséquent, les sites de production et/ou d'accumulation de ce métabolite sont fortement dépendants de l'ensemble du métabolisme lichénique. Ainsi, une généralisation de localisation des métabolites lichéniques n'est pas envisageable. Des études au cas par cas sont nécessaires même au sein d'un même genre.

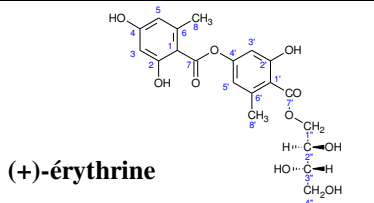
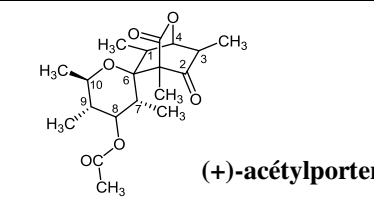
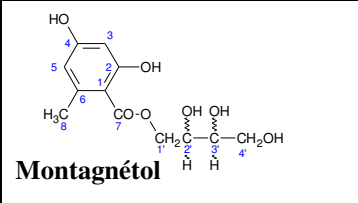
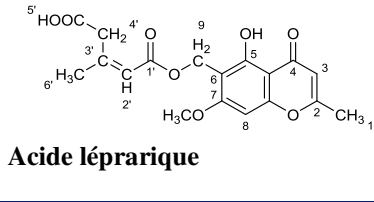
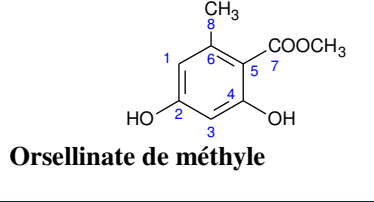
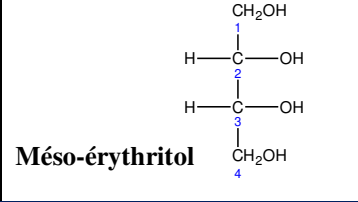
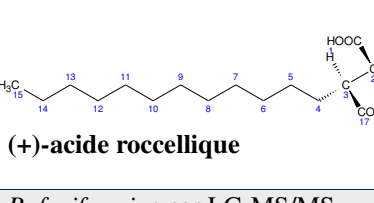
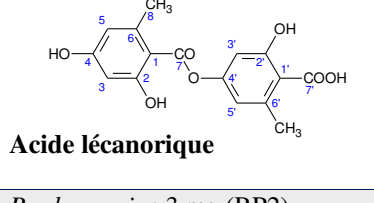
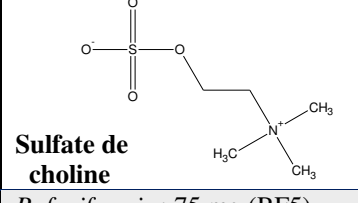
### 2.5.3. Bilan de l'étude chimique de *R. fuciformis* & *R. phycopsis*

Ainsi, à l'issue de ces études chimiques, 7 et 5 différents composés ont été respectivement isolés et identifiés pour *R. fuciformis* et *R. phycopsis* (**Tableau 14**). D'autre part, des composés minoritaires non isolés ont pu également être mis en évidence au travers des profils chimiques réalisés par LC-ESI-MS/MS, des voies de fragmentations proposées et également à partir des données

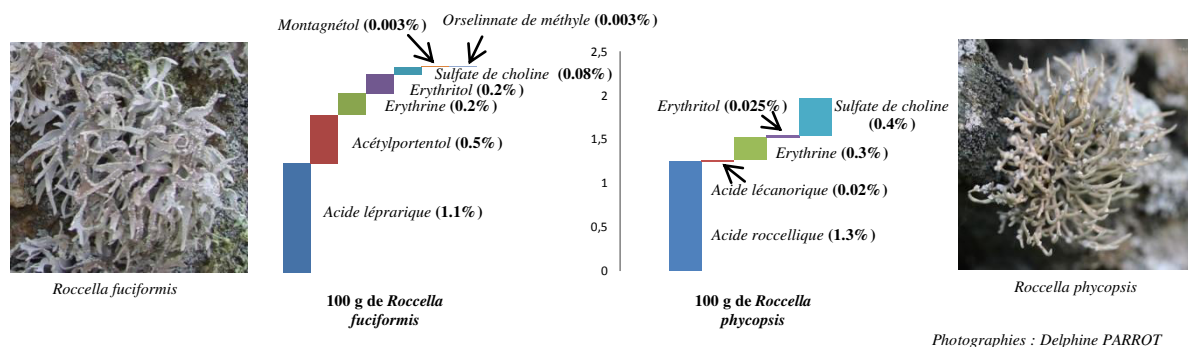


bibliographiques disponibles<sup>71,72,91</sup>. En conséquence, la quasi-totalité des métabolites décrits pour ces deux espèces lichéniques (cf. Partie 1) ont été soit identifiés par LC/MS et/ou soit isolés et identifiés par analyses structurales. Parmi ces métabolites, la picroroccelline, l'aspicilline et le portentol n'ont pas été mis en évidence au cours de cette étude. Cependant, il est à noter que la picroroccelline a été isolée et identifiée une seule fois au sein de *Roccella fuciformis*<sup>69</sup> et non retrouvée depuis. Ce métabolite est-il réellement produit par *R. fuciformis* ?

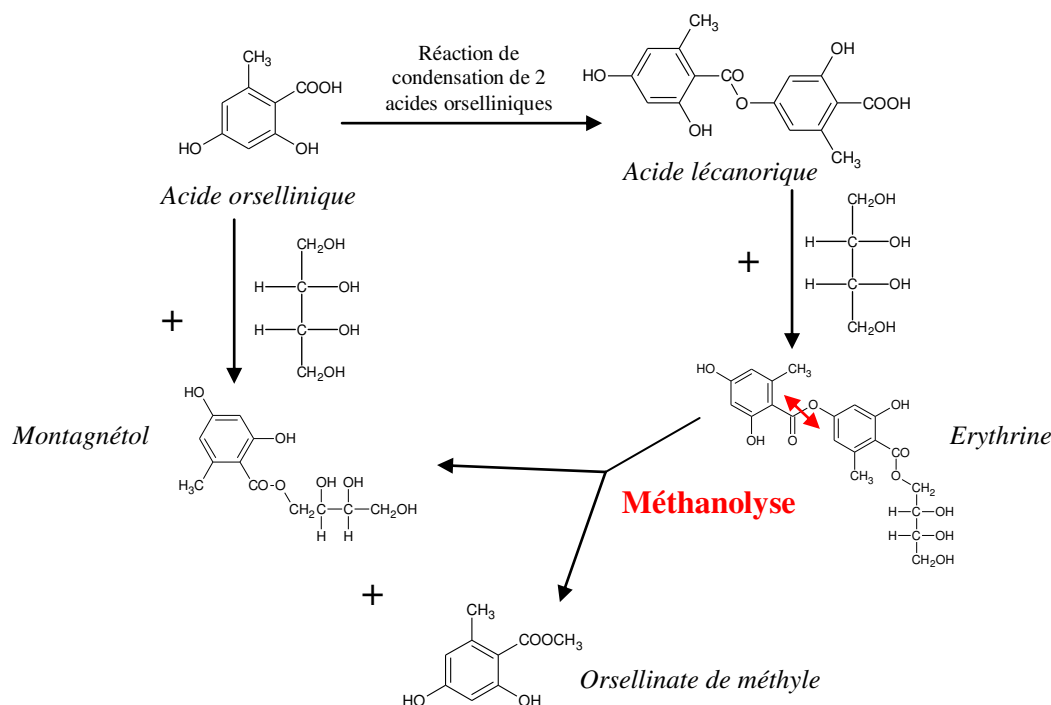
**Tableau 14 : Bilan des métabolites isolés des deux espèces du genre *Roccella* (structures, quantités et codes des composés)**

Structures/espèces lichéniques		
 <p><b>(+)-érythrine</b></p>	 <p><b>(+)-acétylportentol</b></p>	 <p><b>Montagnétol</b></p>
<p><i>R. fuciformis</i> : 205 mg (RF3)  <i>R. phycopsis</i> : 51 mg (RP3)</p>	<p><i>R. fuciformis</i> : 466 mg (RF1)</p>	<p><i>R. fuciformis</i> : 3 mg (RF6)  <i>R. phycopsis</i> : par LC-MS/MS</p>
 <p><b>Acide léprarique</b></p>	 <p><b>Orsellinate de méthyle</b></p>	 <p><b>Méso-érythritol</b></p>
<p><i>R. fuciformis</i> : 1.07 g (RF2)</p>	<p><i>R. fuciformis</i> : 3 mg (RF7)</p>	<p><i>R. fuciformis</i> : 187 mg (RF4)  <i>R. phycopsis</i> : 5 mg (RP4)</p>
 <p><b>(+)-acide roccelique</b></p>	 <p><b>Acide lécanorique</b></p>	 <p><b>Sulfate de choline</b></p>
<p><i>R. fuciformis</i> : par LC-MS/MS  <i>R. phycopsis</i> : 250 mg (RP1)</p>	<p><i>R. phycopsis</i> : 3 mg (RP2)</p>	<p><i>R. fuciformis</i> : 75 mg (RF5)  <i>R. phycopsis</i> : 85 mg (RP5)</p>

D'après cette étude, les deux espèces présentent des marqueurs moléculaires pouvant servir à leur identification. En effet, *R. fuciformis* est caractérisé par la présence d'acide léprarique (majoritaire : 1.1%) et d'acétylportentol (majoritaire : 0.47%) alors que *R. phycopsis* est caractérisé par la présence d'un diacide aliphatique (majoritaire : 1.25%) et d'une depside : l'acide lécanorique (minoritaire : 0.015%) (**Figure 47**). De plus, ces métabolites spécifiques caractéristiques sont localisés à des endroits différents au sein du thalle : l'acide léprarique au niveau du cortex et de la médulle alors que l'acide roccelique est localisé spécifiquement au niveau des soralies, ce qui suggère des rôles au sein du thalle lichénique spécifiques pour chacun d'entre eux. Ainsi, la composition chimique et la localisation des métabolites spécifiques apportent des informations supplémentaires dans l'identification de ces deux espèces.



Mais pour ces deux espèces subsiste encore une incertitude concernant le montagnétol. Est-il réellement produit par le lichen ou est-il uniquement présent suite à une méthanolyse de l'érythrine ? En effet, l'érythrine, l'acide lécanorique, le montagnétol ainsi que les dérivés orcinol présentent des structures chimiques très proches. L'érythrine peut être à l'origine de la présence du montagnétol sous l'action du méthanol (phénomène de méthanolyse)<sup>96</sup> ou peut être obtenu à partir de ce dernier par des réactions de condensation (Figure 48).

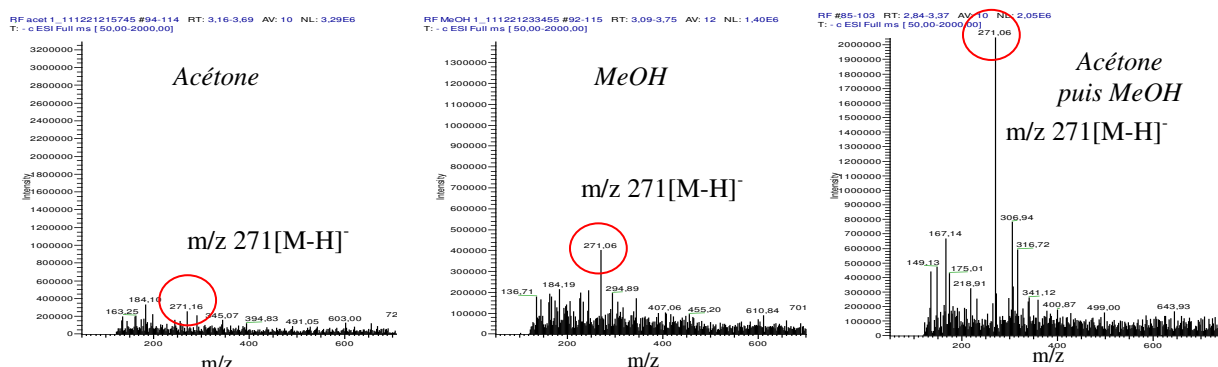


**Figure 48 :** Voies d'interconnexions de l'érythrine, de l'acide lécanorique, du montagnétol et des dérivés orcinol

Afin de déterminer si le montagnétol est constitutif de ces deux espèces lichéniques ou provenant d'une dégradation lors des expériences, une extraction de *R. fuciformis* et de *R. phycopsis* par de l'acétone et/ou par du MeOH dans les mêmes conditions que précédemment (même proportion solide/liquide et agitation) a été réalisée. Les extraits obtenus ont été analysés par LC-MS/MS. La

<sup>96</sup>Huneck, S., Schmidt, J., and Tabacchi, R. (1989) *Zeitschrift für Naturforschung. C* 44, 1283–1289.

présence de montagnétol a été observée dans les trois cas, c'est-à-dire lors de l'extraction à l'acétone, au MeOH et aussi à l'acétone puis au MeOH mais en intensité différente (**Figure 49**). En effet, lors d'une extraction unique à l'acétone, le pic relatif au montagnétol ( $[M-H]^-$   $m/z$  271, est visualisé dans le bruit de fond (intensité faible :  $3.10^5$ ) en comparaison à celui de l'extraction unique au MeOH (intensité :  $5.10^5$ ). Une extraction successive à l'acétone puis au MeOH intensifie le pic du montagnétol (intensité :  $2.10^6$ ). Par conséquent, le montagnétol peut être considéré comme un métabolite spécifique produit naturellement par le lichen mais en proportion très faible. Cette proportion est augmentée artificiellement lors de l'extraction par le MeOH.



**Figure 49** : Spectres de masse (mode négatif) et intensité du pic du montagnétol ( $[M-H]^-$   $m/z$  271) selon le solvant d'extraction

## 2.6. Activités biologiques de composés isolés de *Roccella fuciformis* & *R. phycopsis*

Les tests décrits ci-dessous ont été réalisés au sein de notre laboratoire par Isabelle Rouaud.

### 2.6.1. Tests antioxydants

Lors de cette étude, deux tests ont été réalisés : test DPPH et test de l'anion superoxyde sur les différents métabolites spécifiques purs isolés et identifiés (en quantité suffisante) de *Roccella fuciformis* et de *R. phycopsis*.

#### 2.6.1.1. Résultats du test DPPH

Quatre composés ont été testés : l'érythrine, l'acétylportentol, l'acide roccelique et l'acide léprarique. Les caractéristiques physico-chimiques sont reportées dans le **Tableau 15** ci-dessous.

**Tableau 15** : Tableau récapitulatif des différents composés testés

Composés	Formule brute	Masse molaire (g/mol)
Erythrine	$C_{20}H_{22}O_{10}$	422
Acétylportentol	$C_{19}H_{28}O_6$	352
Acide roccelique	$C_{17}H_{32}O_4$	300
Acide léprarique	$C_{18}H_{18}O_8$	362

En plus des différents composés, deux témoins phénoliques (acide gallique et quercétine) ont été choisis comme substances de référence. Ils ont été testés chacun au cours de chaque expérience à leur  $CI_{50}$ .

Ainsi, les six composés ont montré des activités anti-radicalaires variables vis-à-vis du radical DPPH. Pour chacun d'eux, la  $CI_{50}$  ainsi que l'activité à 3000  $\mu M$  ont été déterminées (**Tableau 16**).

**Tableau 16** : Activités anti-radicalaires des produits (en rouge : témoins phénoliques positifs)

Composés	$CI_{50}$ ( $\mu M$ )		% activité à 3000 $\mu M$	
	Moyenne	Ecart type	Moyenne	Ecart type
<b>Acide gallique</b>	<b>45.00</b>	<b>5.00</b>		
<b>Quercétine</b>	<b>42.00</b>	<b>3.00</b>		
Erythrine	> 3000	-	5.37	1.82
Acétylportentol	> 3000	-	0.00	0.00
Acide roccellique	> 3000	-	0.00	0.00
Acide léprarique	> 3000	-	0.43	0.57

De ces résultats il en résulte que les quatre composés testés n'ont aucune activité. Les  $CI_{50}$  ne sont pas atteintes. A une concentration de 3000  $\mu M$ , leur activité par rapport au témoin est de  $5.37 \pm 1.82$  % pour l'érythrine,  $0.43 \pm 0.57$  % pour l'acide léprarique et nulle pour les deux autres composés.

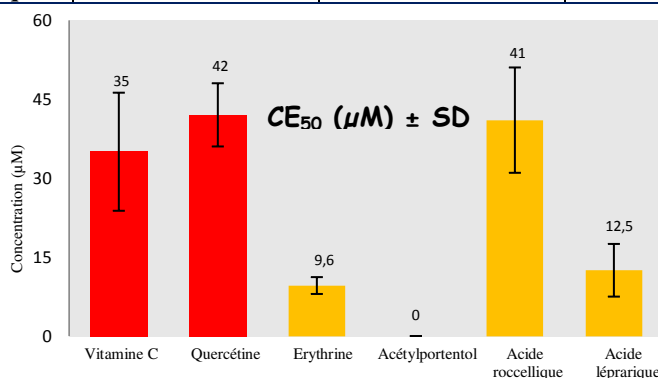
### 2.6.1.2. Résultats du test de l'anion superoxyde

Notre étude a consisté à étudier le pouvoir piégeant de l'anion superoxyde des quatre composés (**Tableau 17, Figure 50**).

Deux composés ont été choisis comme témoins positifs : la vitamine C ( $CE_{50}$  (Concentration efficace permettant de piéger 50% du produit testé) = 35  $\mu M$ ) et la quercétine ( $CE_{50}$  = 42  $\mu M$ ).

**Tableau 17** : Pouvoir piégeant de l'anion superoxyde des produits (en rouge : témoins positifs)

Composés	$CE_{50}$ ( $\mu M$ )		% activité à 350 $\mu M$	
	Moyenne	Ecart type	Moyenne	Ecart type
<b>Vitamine C</b>	<b>35.00</b>	<b>11.21</b>		
<b>Quercétine</b>	<b>42.00</b>	<b>6</b>	<b>83.80</b>	<b>5.52</b>
Erythrine	9.60	1.60	46.02	8.99
Acétylportentol	0.00	0.00	25.63	5.31
Acide roccellique	41.00	10.00	55.31	5.55
Acide léprarique	12.50	5.00	85.50	9.49



**Figure 50** : Représentation graphique du pouvoir piégeant de l'anion superoxyde par les produits (en rouge : témoins positifs)

Deux des quatre composés ont une  $CE_{50}$  plus faible que celle de la vitamine C et de la quercétine : l'érythrine  $9.6 \pm 1.6 \mu M$ , l'acide léprarique  $12.5 \pm 5.0 \mu M$ . L'acide roccelique a une  $CE_{50}$  proche de celle du témoin  $41.0 \pm 10.0 \mu M$ . L'acétylportentol ne possède pas d'activité. Ainsi, l'érythrine, l'acide léprarique et l'acide roccelique présenteraient des potentiels de piégeage vis-à-vis de l'anion superoxyde mais qui restent à confirmer par la réalisation de tests supplémentaires.

### 2.6.3. Tests de mesure de l'activité antiproliférative

Deux tests de mesure de l'activité antiproliférative ont été réalisés sur les quatre mêmes métabolites spécifiques isolés de *Rocella fuciformis* & *R. phycopsis* (Tableaux 18 et 19). L'un a été effectué au sein de notre laboratoire sur 3 lignées cellulaires (HaCaT, A375p et B16-F10) par Isabelle Rouaud. L'autre test a été effectué sur la plateforme ImpACcell (Structure Fédérative de recherche BIOSIT, Rennes) à dose unique à  $25 \mu M$  sur 8 lignées cellulaires (HuH7, CaCo-2, MDA-MB-231, HCT116, PC3, NCI-H727, HaCaT et lignée diploïde de fibroblastes de peau humaine).

L'objectif a été de déterminer la toxicité cellulaire des produits (Tableaux 18 et 19) au bout de 48 h d'incubation en fonction de leur concentration. On pourra ainsi définir la  $CI_{50}$  (concentration qui entraîne 50% de mortalité cellulaire).

Les résultats obtenus pour les deux tests de cytotoxicité réalisés sont décrits dans les tableaux 18 et 19.

**Tableau 18 : Résultats de la  $CI_{50}$  ( $\mu M$ ) sur A375m, A375p, HaCaT et B16-F10 des composés (en rouge : témoins positifs)**

	IC <sub>50</sub> en $\mu M$			
	A375m	A375p	HaCaT	B16-F10
Erythrine	> 100	> 100	> 100	> 100
Acétylportentol	> 100	> 100	> 100	> 100
Acide roccelique	> 100	> 100	> 100	> 100
Acide léprarique	> 100	> 100	> 100	> 100
Vincristine	$9 \cdot 10^{-3}$	$3,8 \cdot 10^{-1} \pm 6 \cdot 10^{-2}$	$5 \cdot 10^{-3} \pm 1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-2} \pm 4 \cdot 10^{-3}$
Doxorubicine	$3,5 \cdot 10^{-1}$	$3,3 \cdot 10^{-1} \pm 3 \cdot 10^{-2}$	$5 \cdot 10^{-1} \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$3,1 \cdot 10^{-1} \pm 6 \cdot 10^{-2}$

**Tableau 19 : Résultats de viabilité (en %) à  $25 \mu M$  obtenues sur les 8 lignées cellulaires testées sur la plateforme ImpACcell (en rouge : témoins positifs)**

Type cellulaire	viabilité (%) à $25 \mu M$ (48 h dose unique)							
	HuH7 Hépatome	CaCo-2 Colon	MDA-MB-231 Mammaire	HCT116 Colon	PC3 Prostate	NCI-H727 Poumon	HaCaT Epithéliale	Fibro Epithéliale
Erythrine	108	96	76	120	114	87	96	97
Acétylportentol	102	103	84	106	107	71	103	98
Acide roccelique	106	149	86	117	104	117	94	98
Acide léprarique	100	140	94	117	105	103	95	100
Roscovitrine	21	3	21	10	24	30	6	53
Doxorubicine	63	43	82	22	34	65	88	74
Taxol	36	29	41	9	35	59	11	76
DMSO	100	100	100	100	100	100	100	100

On observe que les taux de viabilité des quatre composés sont supérieurs à plus de 76% quelque soit la lignée cellulaire étudiée. Ainsi l'acide léprarique, l'acide roccellique, l'acétylportentol et l'érythrine sont peu toxiques vis-à-vis des cellules testées.

#### 2.6.4. Tests antibactériens

Différents composés et extraits totaux ont été testés en triplicat afin de déterminer leur potentiel en tant qu'agent antibactérien : l'érythrine, l'acide roccellique, l'acide léprarique, l'érythritol, l'acétylportentol, l'extrait total de *R. fuciformis* ainsi que celui de *R. phycopsis*. Les cibles choisies sont des bactéries Gram+ : *Staphylococcus aureus* CIP 4.38, *Staphylococcus epidermidis* CIP 6821, *S. epidermidis* CIP 8155 et des bactéries Gram- : *Escherichia coli* CIP 53126 et *Pseudomonas aeruginosa* CIP 100.720.

Les composés purs ont été testés en triplicat à deux concentrations : 1 mg/mL et 50 mg/mL. 20 µL ont été déposés par disques, soit une quantité de 20 µg et d'1 mg par disque. Les cibles bactériennes ont étéensemencées sur milieu Müller Hilton et la CMI des produits actifs a été déterminée comme décrit dans la partie Matériels & Méthodes.

Les tests réalisés par la méthode des disques ont mis en évidence les propriétés antibactériennes pour l'acide léprarique et l'acide roccellique à une concentration de 50 mg/mL (soit 1 mg déposé) (Tableau 20). Cependant, cette activité n'a pas été retrouvée lors de la détermination de la CMI pour des gammes partant de 256 µg/mL à 0.03 µg/mL et de 256 mg/mL à 0.03 mg/mL englobant donc la concentration de 50 mg/mL. Ceci peut s'expliquer par la mise en évidence d'un diamètre d'inhibition très faible par la méthode des disques mais non significatif (Tableau 20). En conséquence, les souches du genre *Staphylococcus* sont résistantes à l'acide léprarique et à l'acide roccellique par comparaison aux antibiotiques de références : oxacilline, streptomycine, érythromycine etc... (diamètres d'inhibition inférieurs au seuil de sensibilité).<sup>97</sup>

**Tableau 20 : Tests antibactériens réalisés à partir de différents composés purs et extraits de *R. fuciformis* et *R. phycopsis* à 50 mg/mL**

(Diamètres des halos d'inhibition exprimés en mm ± SD, en rouge : composés et/ou extraits positifs)

Extraits testés	<i>S. aureus</i> CIP 4.38	<i>S. epidermidis</i> CIP 8155	<i>S. epidermidis</i> CIP 6821	<i>E. coli</i> CIP 53126	<i>P. aeruginosa</i> CIP 100.720
Acétylportentol	-	-	-	-	-
Acide léprarique	8.9 ± 0.3	8.7 ± 0.6	8.9 ± 0.2	-	-
Acide roccellique	8.9 ± 0.2	-	-	-	-
Erythrine	-	-	-	-	-
Erythritol	-	-	-	-	-

<sup>97</sup>Courvalin, P., Dubreuil, L., Jarlier, V., Jehl, F., Lambert, T., Leclercq, R., Lina, G., Merens, A., Plesiat, P., Ploy, M. C., Quentin, C., Soussy, C. J., Varon, E., and Weber, P. (2013) Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie, p 60.

En conclusion, les métabolites spécifiques testés ne présentent pas d'activités antibactériennes vis-à-vis des souches testées.

### 3. Conclusion et perspectives de l'étude chimique

Au travers de ces études lichéniques multiples et variées, de nombreux points ont été mis en évidence. Tout d'abord, une méthode d'extraction a été optimisée et a permis de mettre en évidence l'impact du système de broyage, des solvants d'extraction, du ratio solide/liquide ou encore de l'agitation sur le rendement d'extraction et de déterminer les meilleures conditions pour obtenir des profils chimiques les plus complets possibles. Par la suite, le profilage chimique qualitatif de l'ensemble des neuf espèces lichéniques étudiées a montré la similarité métabolomique entre les différents cyanolichens (*C. auriforme*, *C. cristatum*, *C. fuscovirens*, *L. confinis*, *L. pygmaeae*, *L. lichenoides* et *S. symphorea*) d'une part et les deux espèces lichéniques à algue verte (*R. fuciformis* et *R. phycopsis*) d'autre part rapprochant ainsi les profils métaboliques en fonction de la nature du photobionte (algues verte ou cyanobactéries) plus qu'en fonction de leurs environnements géographiques (côtiers ou terrestres). Différents métabolites connus ont ainsi pu être mis en évidence par LC/MS pour les deux espèces lichéniques du genre *Rocella* mais très peu, voire aucun métabolite connu n'a été mis en évidence pour les 7 cyanolichens. Par conséquent, la composition chimique des cyanolichens reste encore énigmatique.

L'étude chimique de *R. phycopsis* et de *R. fuciformis* a permis d'isoler et d'identifier neuf métabolites connus en quantité suffisante pour étudier leurs propriétés biologiques. Ainsi, parmi les quatre métabolites testés (acétylportentol, érythrine, acide léprarique et acide roccellique), des propriétés antioxydantes (érythrine et acide léprarique) ont été découvertes mais aucune activité antibactérienne n'a été mise en évidence. La localisation des métabolites spécialisés lichéniques au sein des thalles pourrait influencer la localisation, la diversité et le métabolisme de leurs communautés bactériennes associées malgré une activité antibactérienne non significative vis-à-vis des bactéries testées.

Dans un objectif d'une meilleure compréhension des interactions symbiotiques, le manque d'information et la difficulté d'étudier la composition chimique des cyanolichens ne permet pas à l'heure actuelle d'émettre des hypothèses sur l'impact de leur métabolisme sur les communautés bactériennes associées.

Qu'en est-il des communautés bactériennes associées aux lichens: abondance, diversité, localisation et production chimique ? Ce point sera abordé plus en détails dans le Chapitre 2 - Partie 1. Elle regroupera les données bibliographiques disponibles sur les communautés bactériennes associées aux lichens : localisation, diversité et production chimique.



## Références bibliographiques (Chapitre 1)

---

- (40) Boustie, J., and Grube, M. (2005) Lichens-a promising source of bioactive secondary metabolites. *Plant Genetetic Resources* 3, 273–28.
- (41) Dobson, F. (2005) Lichens : An illustrated guide to the British and Irish species Shoulg, Royaume-Uni, pp 1–480.
- (42) Nash, T. H. (2008) Lichen Biology, Cambridge, Royaume-Uni, p 498.
- (43) Ozenda, P., and Clauzade, G. (1970) Les lichens : étude biologique et flore illustrée Masson, Paris, p 801.
- (44) Raven, P. H., Evert, R. F., and Eichhorn, E. (2000) Biologie végétale De Boeck, Royaume-Uni, p 733.
- (45) Purvis, W. (2000) Lichens, London, p 112.
- (46) Stocker-Wörgötter, E. (2008) Metabolic diversity of lichen-forming ascomycetous fungi: culturing, polyketide and shikimate metabolite production, and PKS genes. *Natural Products Reports* 25, 188–200.
- (47) De Castro, J. . J. V., Mu, H., Berg, G., Grube, M., Cardinale, M., and Müller, H. (2009) Species-specific structural and functional diversity of bacterial communities in lichen symbioses. *ISME Journal of Systematics and Microbiology Ecology* 3, 1105–15.
- (48) Coxson, D. S., and Nadkarni, N. M. (1995) Ecological roles of epiphytes Forest, in *Ecological Roles of Epiphytes in Nutrient Cycles*, pp 495–543.
- (49) Barger, N. N., Herrick, J. E., Zee, J., and Belnap, J. (2006) Impacts of Biological Soil Crust Disturbance and Composition on C and N Loss from Water Erosion. *Biogeochemistry* 77, 247–263.
- (50) Lalley, J. S., and Viles, H. A. (2007) Recovery of lichen-dominated soil crusts in a hyper-arid desert. *Biodiversity & Conservation* 17, 1–20.
- (51) Evans, R. D., and Lange, O. L. (2003) Biological Soil Crusts and Ecosystem Nitrogen and Carbon Dynamics, in *Biological Soil Crustd: Structure, Function, and Management*, pp 263–279.
- (52) Evans, R. D., and Johansen, J. R. (1999) Microbiotic Crusts and Ecosystem Processes. *Plant Sciences* 18, 183–225.
- (53) Longton, R. E. (1988) The biology of polar bryophytes and lichens Cambridge, Royaume-Uni, p 391.
- (54) Delmail, D., Grube, M., Parrot, D., Cook-moreau, J., Boustie, J., Labrousse, P., and Tomasi, S. (2013) Ecophysiology and Responses of Plants under Salt Stress, Springer, New York, pp 115–148.
- (55) Van Haluwyn, C., and Asta, J. (2009) Guide des lichens de France : Lichens des arbres, Belin, Paris, p 231.



- (56) Biéro, T., Laroubine, C., Lottin, N., and Vaudoré, D. (2008) Les lichens de Normandie (Actes du Colloque). *Val d'Orne Environ. Société Linnéenne Normandie Parc Nat. régional Normandie Maine*, p 94.
- (57) Sérusiaux, E., Diederich, P., and Lambinon, J. (2004) Les macrolichens de Belgique, du Luxembourg et du nord de la France - Clés de détermination, Luxembourg, p 192.
- (58) Zopf, W. F. (1907) Die Flechtenstoffe: In Chemischer, Botanischer, Pharmakologischer Und Technischer Beziehung, Germany, p 468.
- (59) Elix, J. A., and Stocker-Wörgötter, E. (2008) Chapitre 7. Biochemistry and secondary metabolites, in *Lichen Biology*, Cambridge, Royaume-Uni, pp 1116–145.
- (60) Bandaranayake, W. M. (1997) Mycosporines : are they nature's sunscreens ? *Natural Products Reports* 159–172.
- (61) Bačkorová, M., Jendželovský, R., Kello, M., Bačkor, M., Mikeš, J., and Fedoročko, P. (2012) Lichen secondary metabolites are responsible for induction of apoptosis in HT-29 and A2780 human cancer cell lines. *Toxicology In Vitro* 26, 462–8.
- (62) Oetl, S. K., Gerstmeier, J., Khan, S. Y., Wiechmann, K., Bauer, J., Atanasov, A. G., Malainer, C., Awad, E. M., Uhrin, P., Heiss, E. H., Waltenberger, B., Remias, D., Breuss, J. M., Boustie, J., Dirsch, V. M., Stuppner, H., Werz, O., and Rollinger, J. M. (2013) Imbricaric acid and perlatolic acid: multi-targeting anti-inflammatory depsides from *Cetrelia monachorum*. *PLoS One* 8, 1–10.
- (63) Nguyen, K.-H., Chollet-Krugler, M., Gouault, N., and Tomasi, S. (2013) UV-protectant metabolites from lichens and their symbiotic partners. *Natural Products Reports* 30, 1490–508.
- (64) Nardelli, A., Giménez-Arnau, E., Bernard, G., Lepoittevin, J.-P., and Goossens, A. (2009) Is a low content in atranol/chloroatranol safe in oak moss-sensitized individuals? *Contact Dermatitis* 60, 91–5.
- (65) Placzek, M., Frömel, W., Eberlein, B., Gilbertz, K.-P., and Przybilla, B. (2007) Evaluation of phototoxic properties of fragrances. *Acta Dermato-Venereologica* 87, 312–6.
- (66) Aptroot, A., and Schumm, F. (2011) Fruticose *Roccellaceae* - An anatomical-microscopical Atlas and Guide with a worldwide Key and further Notes on some crustose *Roccellaceae* or similar Lichens Booksellers, Germany, p 375.
- (67) Ahti, T., Jorgensen, P. M., Kristinsson, H., Moberg, R., Sochting, U., and Thor, G. (2007) Nordic Lichen Flora, Vol.3 The Nordic., p 219.
- (68) Tiévant, P. (2001) Guide des Lichens Delachaux, Paris, p 304.
- (69) Bohmana-Lindgren, G. (1972) Chemical studies on Lichens - XXXIII Roccanin, a new cyclic tetrapeptide from *Rocella canariensis*. *Tetrahedron* 28, 4625–4630.
- (70) Strack, D., Feige, G. B., and Kroll, R. (1979) Screening of aromatic secondary lichen substances by high performance liquid chromatography. *Zeitschrift für Naturforschung* 34c, 695–698.
- (71) Aberhart, D. J., Overton, K. H., and Hunck, S. (1969) Studies on Lichens Substances. Pat LXII. Aromatic Constituents of the Lichen *Rocella fuciformis* DC. A revised Structure for Lepranic Acid. *Journal of Chemical Society* 8, 704–707.

- (72) Huneck, S., and Yoshimura, I. (1996) Identification of lichen substances, Springer, Berlin, p 493.
- (73) Huneck, S. (1972) 6-Hydroxymethyleugenitin, ein neues chromon aus *Roccella fuciformis*. *Phytochemistry* 11, 1489–1490.
- (74) Culberson, C. F. (1970) Supplement to “Chemical and botanical guide to lichen Products”. *Bryologist* 73, 177–377.
- (75) Culberson, C. F. (1969) Chemical and botanical guide to lichens products (Reprint, Ed.) Lubrecht & Cramer LTD, p 506.
- (76) Bogo, D., de Matos, M. F. C., Honda, N. K., Pontes, E. C., Oguma, P. M., da Santos, E. C. S., de Carvalho, J. E., and Nomizo, A. (2010) In vitro antitumour activity of orsellinates. *Zeitschrift für Naturforschung C* 65, 43–8.
- (77) Roullier, C., Chollet-Krugler, M., Bernard, A., and Boustie, J. (2009) Multiple dual-mode centrifugal partition chromatography as an efficient method for the purification of a mycosporine from a crude methanolic extract of *Lichina pygmaea*. *Journal of Chromatography B* 877, 2067–73.
- (78) Roullier, C., Chollet-Krugler, M., Pferschy-Wenzig, E.-M., Maillard, A., Rechberger, G. N., Legouin-Gargadennec, B., Bauer, R., and Boustie, J. (2011) Characterization and identification of mycosporines-like compounds in cyanolichens. Isolation of mycosporine hydroxyglutamicol from *Nephroma laevigatum* Ach. *Phytochemistry* 72, 1348–57.
- (79) Roullier, C. (2010) Recherche de mycosporines et de dérivés aminés lichéniques d'intérêt pour les cancers photoinduits . Etude phytochimique d'un lichen marin : *Lichina pygmaea* ( Lightf.) C, Université de Rennes 1, p 258.
- (80) Sinha, R. P., Singh, S. P., and Häder, D.-P. (2007) Database on mycosporines and mycosporine-like amino acids (MAAs) in fungi, cyanobacteria, macroalgae, phytoplankton and animals. *J. Photochemistry Photobiology B* 89, 29–35.
- (81) Carreto, J. I., Carignan, M. O., and Montoya, N. G. (2004) A high-resolution reverse-phase liquid chromatography method for the analysis of mycosporine-like amino acids (MAAs) in marine organisms. *Marine Biology* 146, 237–252.
- (82) Roullier, C., Chollet-Krugler, M., Weghe, P. Van De, Devehat, F. L.-L., and Boustie, J. (2010) A novel aryl-hydrazide from the marine lichen *Lichina pygmaea*: isolation, synthesis of derivatives, and cytotoxicity assays. *Bioorganics Medicinal Chemistry Letters* 20, 4582–6.
- (83) Torres, A., Hochberg, M., Pergament, I., Smoum, R., Niddam, V., Dembitsky, V. M., Temina, M., Dor, I., Lev, O., Srebnik, M., and Enk, C. D. (2004) A new UV-B absorbing mycosporine with photo protective activity from the lichenized ascomycete *Collema cristatum*. *European Journal of Biochemistry* 271, 780–784.
- (84) Büdel, B., Karsten, U., and Garcia-Pichel, F. (1997) Ultraviolet-absorbing scytonemin and mycosporine-like amino acid derivatives in exposed, rock-inhabiting cyanobacterial lichens. *Oecologia* 112, 165–172.
- (85) Temina, M., Levitsky, D. O., and Dembitsky, V. M. (2010) Chemical Constituents of the Epiphytic and Lithophilic Lichens of the Genus *Collema*. *Recent Natural Products* 4, 79–86.

- (86) Honegger, R., Axe, L., and Edwards, D. (2013) Bacterial epibionts and endolichenic actinobacteria and fungi in the Lower Devonian lichen *Chlorolichenomycites salopensis*. *Fungal Biology* 117, 512–8.
- (87) Parrot, D., Peresse, T., Hitti, E., Carrié, D., Grube, M., and Tomasi, S. (2014) Qualitative and spatial metabolite profiling of lichens by LC-MS approach combined with optimization extraction. *Phytochemical Analysis* (sous presse).
- (88) Mandal, V., Mohan, Y., and Hemalatha, S. (2008) Microwave assisted extraction of curcumin by sample–solvent dual heating mechanism using Taguchi L9 orthogonal design. *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis* 46, 322–327.
- (89) Amarouche, S. (2013) Caractérisation d’une méthode de mesure : étape clé dans le processus de validation. *Technique de l’ingénieur, ressources documentaires* 1–18.
- (90) Laessøe, T., Srikitikulchai, P., Fournier, J., Köpcke, B., and Stadler, M. (2010) Leprarie acid derivatives as chemotaxonomic markers in *Hypoxylon aeruginosum*, *Chlorostroma subcubisporum* and *C. cyaninum*, sp. nov. *Fungal Biology* 114, 481–9.
- (91) Huneck, S. (1968) Flechteninhaltsstoffe - XXXI Massenspektrometrie und ihre anwendung auf strukturelle und stereochemische probleme - CXXIII Massenspektrometrie von depsiden, depsidonen, depsonen, dibenzofuranen und diphenylbutadienen mit positiven und negativen ionen. *Tetrahedron* 24, 2707–2755.
- (92) Whitehead, K., and Hedges, J. I. (2002) Analysis of mycosporine-like amino acids in plankton by liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. *Marine Chemistry* 80, 27–39.
- (93) Carreto, J. I., and Carignan, M. O. (2011) Mycosporine-like amino acids: relevant secondary metabolites. Chemical and ecological aspects. *Marine Drugs* 9, 387–446.
- (94) Pettit, G. R., Zhang, Q., Pinilla, V., Herald, D. L., Doubek, D. L., and Duke, J. A. (2004) Isolation and structure of gustastatin from the Brazilian nut tree *Gustavia hexapetala*. *Journal of Natural Products* 67, 983–5.
- (95) Geiger, M. (2009) Mise au point d’une démarche de profilage des métabolites primaires et secondaires du lichen *Roccella fuciformis*. Application à l’étude du métabolisme en réponse à différentes conditions environnementales, Rennes, p 19.
- (96) Huneck, S., Schmidt, J., and Tabacchi, R. (1989) Thermal decomposition of lichen depsides. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 44, 1283–1289.
- (97) Courvalin, P., Dubreuil, L., Jarlier, V., Jehl, F., Lambert, T., Leclercq, R., Lina, G., Merens, A., Plesiat, P., Ploy, M. C., Quentin, C., Soussy, C. J., Varon, E., and Weber, P. (2013) Comité de l’antibiogramme de la société française de microbiologie, p 60.

## *Chapitre 2 - Les lichens : une nouvelle niche bactérienne ?*

---



## *PARTIE 1 - Etat de l'art sur les bactéries associées aux lichens*

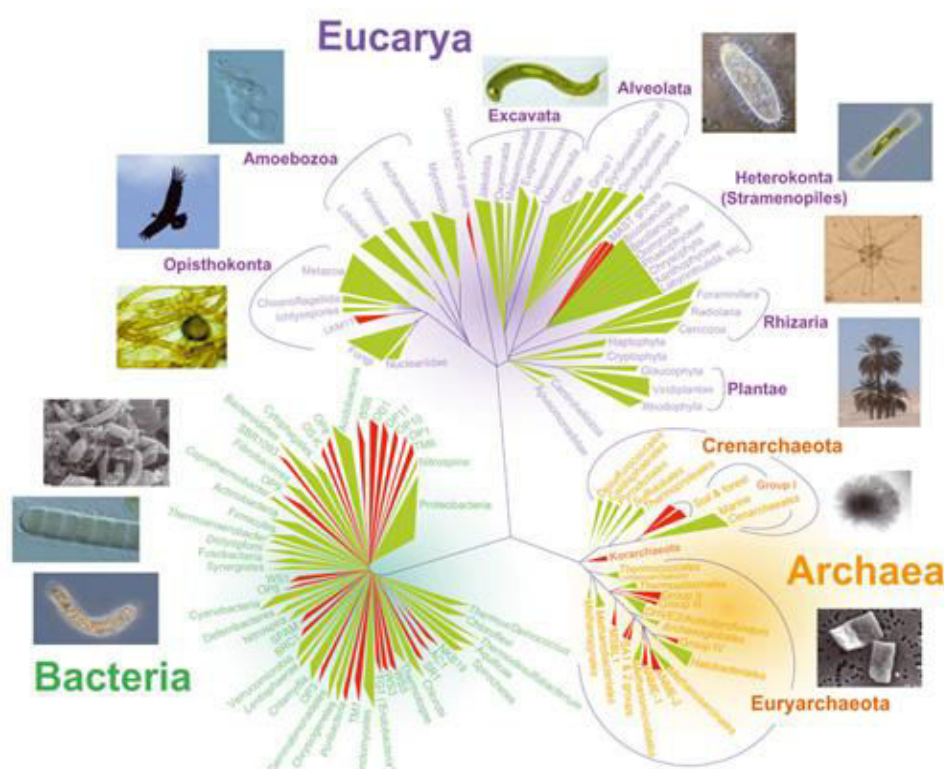
---



Cette troisième partie à vocation bibliographique regroupe l'ensemble des données publiées concernant les communautés bactériennes associées aux lichens et abordant notamment leur abondance, diversité, localisation, écologie ainsi que leur production métabolique et leur activité biologique.

## 1. Généralités sur les micro-organismes procaryotes : *Bacteria et Archaea*

En 1937, le protozoologiste Edouard Chatton propose une classification basée sur la nature des types cellulaires et introduit ainsi les notions de « **Eucaryotes** » (pluricellulaires) et de « **Procaryotes** » (unicellulaires). Puis, en 1990, Carl Woese, un microbiologiste analyse les séquences de l'ARNr 16S et divise les Procaryotes en deux : les Bacteria et les Archaea basé sur des différences moléculaires. Ainsi, 3 domaines sont définis : les **Eucaryotes** (plantes, animaux, protistes et champignons), les **Bacteria** et les **Archaea** (**Figure 51**)<sup>98</sup>. Par le développement d'analyses génétiques (séquençage du gène de l'ARNr 16S, analyses de pyroséquençage, etc.), la comparaison et la classification des organismes entre-eux peuvent être rendus possibles. Les lichens du fait de leur complexité symbiotique appartiennent à la fois au règne des Champignons pour le mycobionte, à celui des Végétaux (photobiontes, algues vertes) (domaine des Eucaryotes) et/ou même au domaine des Bacteria (photobiontes, *Cyanobacteria*).



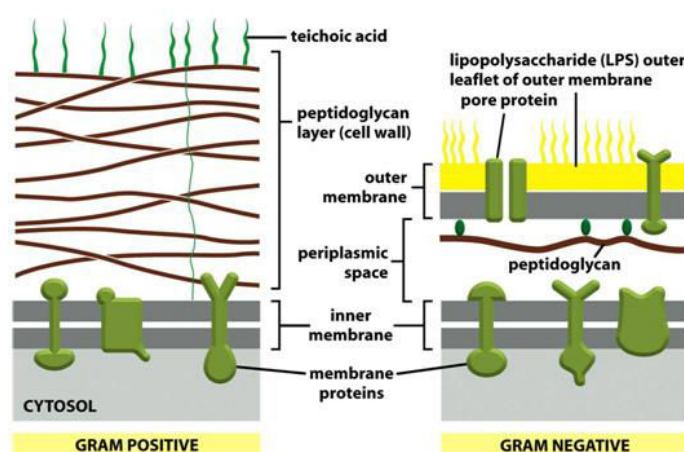
**Figure 51 : Arbre du vivant basé sur l'ARNr 16S**

(<http://accres.ens-lyon.fr>)

<sup>98</sup>Bertrand, J.-C., Caumette, P., Lebaron, P., Matheron, R., Normand, P. (2011) *Ecologie microbienne Microbiologie des milieux naturels et anthropisés*; Presses Universitaires de Pau et des pays de l'Adour, pp 1002.



Les procaryotes sont des micro-organismes unicellulaires possédant de manière générale des cellules de petites tailles, de l'ordre du micromètre en forme de coques (sphériques) ou de bâtonnets (allongés droits, incurvés ou spiralés). Cependant, quelque soit leur forme et leur taille, l'organisation cellulaire reste strictement la même, c'est-à-dire des enveloppes cellulaires plus ou moins complexes délimitant le cytoplasme (contenant les plasmides, ribosomes, chromosomes etc...) de l'environnement extérieur. La composition de ces enveloppes cellulaires (paroi et membrane cytoplasmique) permet de différencier 3 groupes de procaryotes : les mycoplasmes (dépourvus de paroi), les bactéries de coloration Gram positif (Gram +, paroi constituée d'une couche épaisse de peptidoglycane ou de muréine) et les bactéries de coloration Gram négatif (Gram -, présence d'une membrane externe et d'une couche peptidoglycane réduite)<sup>98</sup> (**Figure 52**).



**Figure 52 : Composition de l'enveloppe cellulaire des bactéries de type Gram + et Gram -**

(Université de Laval : <http://archimede.bibl.ulaval.ca>)

De plus, plusieurs types nutritionnels sont définis chez les micro-organismes selon la nature de la source d'énergie (chimique ou photonique utilisant une source organique ou minérale) et selon le composé (organique ou minéral) utilisé comme source de carbone. Ainsi, le métabolisme cellulaire est constitué de réactions d'oxydo-réduction (production d'énergie par catabolisme) et de réactions de biosynthèses (production des constituants cellulaires par anabolisme). Cependant, au niveau d'une communauté bactérienne au sein d'un écosystème, le catabolisme cellulaire se traduit par un rôle de décomposeur ou de minéralisateur alors que l'anabolisme correspond à la production de biomasse pour les chaînes trophiques.<sup>98</sup>

Ainsi, les micro-organismes sont divers, ont des rôles importants dans les écosystèmes et sont à l'origine de la synthèse d'environ 23000 métabolites bioactifs.<sup>4</sup> Qu'en est-il au sein du micro-écosystème que constitue le lichen ?

## 2. Le bactériobionte ou communautés bactériennes associées aux lichens

Les lichens possèdent une grande diversité de communautés bactériennes considérées comme étant une partie intégrante du thalle lichénique (Figure 53).<sup>25,30,31</sup>



**Figure 53 : (A) Photographie de *Stereocaulon montagneum* et (B) Microscopie électronique à balayage de la surface lichénique supérieure de *Stereocaulon montagneum* montrant les communautés bactériennes épilithiques associées<sup>99</sup>**

Par conséquent, les lichens constituent un micro-écosystème complexe. Qu'en est-il de l'état de l'art de cette niche bactérienne originale et peu connue : abondance, diversité, production chimique ?

### 2.1. Abondance, diversité et localisation

Les communautés bactériennes associées aux lichens ont été reportées comme étant abondantes et pouvant représenter des millions de cellules bactériennes par gramme de thalles lichéniques.<sup>26,31</sup> Ces organismes associés colonisent en particulier les surfaces hydrophiles des lichens et sont dans une certaine mesure incorporés également au sein de la matrice extracellulaire fongique.<sup>100</sup>

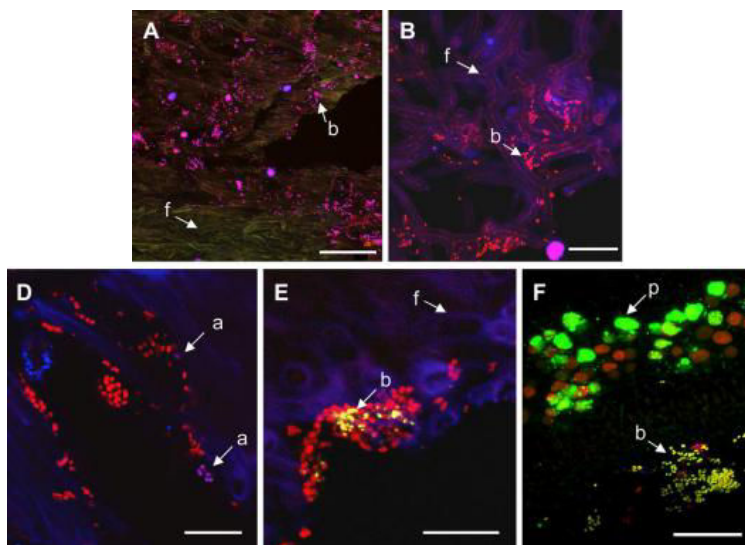
#### 2.1.1. Abondance et localisation par FISH/CLSM

Des études *in situ*, par FISH/CLSM (hybridation *in situ* couplée à de la microscopie confocale) ont été menées afin de mettre en évidence les communautés bactériennes associées aux lichens. Leur abondance, leur diversité ainsi que leur localisation (externe ou interne aux thalles lichéniques) ont été analysées. Ainsi, par cette approche, l'abondance bactérienne associée à *Cladonia arbuscula* a été évaluée comme étant de l'ordre de  $6.10^7$  bactéries par gramme de ce lichen. Une répartition des phyla a été décrite comme suit : *Alphaproteobacteria* (plus de 60% de toutes les bactéries) suivie par les *Actinobacteria* et les *Firmicutes* (inférieur à 10%).<sup>26</sup> D'autre part, les communautés bactériennes associées à ce même lichen étaient plus denses au niveau de la surface interne par rapport à la surface externe. De plus, une haute densité ( $2.1 \pm 0.38.10^8$  bactéries par gramme de thalle) de bactéries a été mise en évidence au niveau de la couche interne des podéties de

<sup>99</sup> Ismed, F. (2012) Phytochimie de lichens du genre *Stereocaulon* : étude particulière de *S. halei* Lamb et *S. montagneum* Lamb, deux lichens recoltés en Indonésie, p 284, Université de Rennes 1.

<sup>100</sup> Grube, M., Berg, G., Andr sson,  . S., Vilhelmsson, O., Dyer, P. S., and Miao, V. P. W. (2014) in *The Ecological Genomics of Fungi*, pp 191–212.

*C. arbuscula* où ces dernières colonisaient la surface en formant un biofilm bactérien. Au sein du lichen *Cetraria islandica*, une dominance d'*Alphaproteobacteria* a été observée au niveau de la face supérieure du thalle lichénique mais avec une absence totale de bactéries au niveau de la couche algale (Figure 54).<sup>26,30</sup>



**Figure 54 : Communautés bactériennes associées à *Cladonia arbuscula* et à *Cetraria islandica* visualisées par FISH/CLSM<sup>30</sup>**

(A. surface interne des podéties (f : plectenchyme du mycobionte, b : colonies bactériennes) ; B. bactéries au niveau des hyphes (b) et au niveau de la surface externe (f) ; D. section montrant les Actinobacteria (a) parmi les autres Eubacteria ; E. Proteobacteria (b, jaune) ; F. section de thalle de *Cetraria islandica* montrant une dominance d'*Alphaproteobacteria* (b, jaune) au niveau de la surface alors que la couche algale est dépourvue de bactéries (p))

D'autre part, une étude récente<sup>34</sup> a également permis de mettre en évidence l'abondance et la dominance des *Alphaproteobacteria* et des *Acidobacteria* au sein de 6 lichens terricoles alpins (*Arthrorhaphis citrinella*, *Baeomyces placophyllus*, *Beomyces rufus*, *Icmadophila ericetorum*, *Psora decipiens* et *Trapeliopsis granulosa*) et de souligner les difficultés d'étudier ces communautés bactériennes associées aux lichens par FISH/CLSM.

En effet, ces approches de localisation *in situ* des communautés bactériennes associées aux lichens (ou à tout autre organisme) sont dépendantes des conditions d'hybridation et du choix des amorces. En l'occurrence, l'hybridation des amorces peut être dépendante de plusieurs facteurs (nature du lichen, éléments du sol : grains de sables par exemple, etc...) et ainsi entraver l'hybridation des amorces et impliquer une mauvaise ou une absence de visualisation des communautés bactériennes par microscopie confocale.<sup>34</sup>

### 2.1.2. Abondance et diversité bactérienne associée : études dépendantes et indépendantes de la culture

Plusieurs études, basées soit sur une approche dépendante de la culture soit sur une approche indépendante de la culture, ont révélé la présence d'une grande diversité de taxons bactériens.<sup>25,27,29,31-33,101</sup>

Avant l'émergence des techniques basées sur le séquençage du gène de l'ARNr 16S, les genres bactériens suivant ont été mis en évidence : *Azotobacter* (*Proteobacteria*), *Bacillus* (*Firmicutes*), *Beijerinckia* (*Proteobacteria*), *Clostridium* (*Firmicutes*) et *Pseudomonas* (*Proteobacteria*) par des approches dépendantes de la culture et plus précisément par détermination phénotypique.<sup>30</sup>

Alors que suite au développement des techniques de biologie moléculaire et notamment des approches basées sur le séquençage du gène de l'ARNr 16S, une plus importante diversité bactérienne a été montrée.<sup>27,29,33</sup>

L'ensemble des études ont révélé la dominance des *Alphaproteobacteria* au sein des communautés bactériennes associées aux lichens.<sup>28,31,101,102</sup> En effet, cette classe bactérienne peut représenter jusqu'à 60% du phylum des *Proteobacteria* associées aux thalles lichéniques.<sup>26,101</sup> Au sein de *Peltigera membranacea*<sup>100</sup>, par pyroséquençage, 59% des souches bactériennes associées appartenaient aux *Alphaproteobacteria* et 29% aux *Betaproteobacteria* suivie de loin par les *Actinobacteria* et les *Bacteroidetes*, confirmant les observations des autres études.<sup>29,32</sup> D'autre part, le fait d'étudier les communautés bactériennes associées aux lichens a permis (1) de mettre en évidence d'autres lignées et phyla bactériens abondants (*Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Verrucomicrobia*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* et d'autres *Proteobacteria*)<sup>26,28,29,32,103</sup> et (2) des genres moins représentés (*Deinococcus* (*Deinococcus-Thermus*))<sup>39</sup> (**Tableau 21**). Il semblerait que les communautés bactériennes associées seraient spécifiques du lichen hôte.<sup>25,31</sup>

Dans le tableau 21 suivant sont reportés les différents travaux portant sur l'étude des communautés bactériennes associées à des lichens.

<sup>101</sup>Schneider, T., Schmid, E., de Castro, J. V., Cardinale, M., Eberl, L., Grube, M., Berg, G., and Riedel, K. (2011) *Proteomics* 11, 2752–6.

<sup>102</sup>Cardinale, M., Steinová, J., Rabensteiner, J., Berg, G., and Grube, M. (2012) *Environmental Microbiology Reports* 4, 23–28.

<sup>103</sup>Cardinale, M., Grube, M., and Berg, G. (2011) *International Journal of Systematic Evolution and Microbiology* 61, 3033–8.

## Chapitre 2 - PARTIE 1 - Etat de l'art sur les bactéries associées aux lichens.

**Tableau 21 : Récapitulatif des études rapportant des espèces bactériennes associées aux lichens selon les espèces lichéniques et le type de méthodes utilisées**

Lichens	Communautés bactériennes associées					Références
	Phyla	Classes	Familles ou Genres	Méthodes	Approches	
Récolté au Japon	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Streptomyces</i> sp	ARNr 16S	dépendente de la culture	104
<i>Cladonia rangiferina</i>	<i>Proteobacteria</i> <i>Firmicutes</i>	<i>Betaproteobacteria</i> <i>Bacilli</i>	<i>Burkholderia glathei</i> / <i>Burkholderia sordidicola</i> <i>Paenibacillus pabuli</i>	ITS et ARNr 16S	Indépendente de la culture	29
<i>Cladonia pyxidata</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderia glathei</i> / <i>Burkholderia sordidicola</i>	ITS et ARNr 16S	Indépendente de la culture	
<i>Cladonia coccifera</i>	<i>Proteobacteria</i> <i>Firmicutes</i>	<i>Betaproteobacteria</i> <i>Bacilli</i>	<i>Burkholderia phenazinium</i> <i>Paenibacillus amylolyticus</i> / <i>Paenibacillus agarexedens</i>	ITS et ARNr 16S	Indépendente de la culture	
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Paenibacillus mendelii</i> / <i>Paenibacillus phyllosphaerae</i>	ITS et ARNr 16S	Indépendente de la culture	
<i>Hypogymnia physodes</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Paenibacillus pabuli</i> / <i>Paenibacillus amylolyticus</i>	ITS et ARNr 16S	Indépendente de la culture	
<i>Cladonia gracilis</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Streptomyces</i> sp	ARNr 16S	dépendente de la culture	105
Récolté à Tokyo	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Schumannella luteola</i> gen. nov., sp. nov.	ARNr 16S	dépendente de la culture	35
<i>Cladonia arbuscula</i>	<i>Proteobacteria</i> <i>Firmicutes</i>	<i>Betaproteobacteria</i> <i>Bacilli</i>	<i>Burkholderia</i> sp. <i>Paenibacillus</i> <i>Bacillus</i>	SSCP	Indépendente de la culture	31
<i>Lecanora polytropia</i>	<i>Proteobacteria</i> <i>Firmicutes</i>	<i>Betaproteobacteria</i> <i>Bacilli</i> <i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderia</i> sp. <i>Paenibacillus</i> <i>Bacillus</i> / <i>Acinetobacter</i> sp.	SSCP	Indépendente de la culture	
<i>Umbilicaria cylindrica</i>	<i>Proteobacteria</i> <i>Firmicutes</i>	<i>Betaproteobacteria</i> <i>Bacilli</i> <i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderia</i> sp. <i>Bacillus</i> sp. <i>Acinetobacter</i> sp.	SSCP	Indépendente de la culture	
<i>Cladonia arbuscula</i>	<i>Proteobacteria</i> <i>Firmicutes</i>	<i>Alphaproteobacteria</i> <i>Betaproteobacteria</i> <i>Gammaproteobacteria</i> <i>Bacilli</i>	-	SSCP	Indépendente de la culture	26
<i>Hydropunctaria maura</i>	<i>Actinobacteria</i> <i>Crenarchaeota</i> <i>Deinococcus</i> <i>Thermus</i>	<i>Actinobacteria</i>	- - <i>Deinococcus</i> sp.	DGGE, clonage	Indépendente de la culture	39
<i>Ophioparma ventosa</i>	<i>Proteobacteria</i> <i>Chloroflexi</i> <i>Acidobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i> <i>Gammaproteobacteria</i>	-	DGGE, clonage	Indépendente de la culture	39
<i>Pertusaria corallina</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	-	DGGE, clonage	Indépendente de la culture	39
<i>Rhizocarpon geographicum</i>	<i>Acidobacteria</i> <i>Chloroflexi</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	-	DGGE, clonage	Indépendente de la culture	
<i>Parmelia sulcata</i>	<i>Proteobacteria</i> <i>Firmicutes</i> <i>Actinobacteria</i> <i>Acidobacteria</i> <i>Verrucomicrobia</i>	<i>Alphaproteobacteria</i> <i>Actinobacteria</i>	-	pyroséquençage	Indépendente de la culture	25
<i>Rhizoplaca chrysouleuca</i>	<i>Proteobacteria</i> <i>Acidobacteria</i> <i>Firmicutes</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	-	pyroséquençage	Indépendente de la culture	
<i>Umbilicaria americana</i>	<i>Proteobacteria</i> <i>Acidobacteria</i> <i>Firmicutes</i>	<i>Alphaproteobacteria</i> <i>Gammaproteobacteria</i>	-	pyroséquençage	Indépendente de la culture	
<i>Umbilicaria phaea</i>	<i>Proteobacteria</i> <i>Acidobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	-	pyroséquençage	Indépendente de la culture	
<i>Cladonia uncialis</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Streptomyces uncialis</i>	ARNr 16S	dépendente de la culture	37,106
Récoltés au Japon	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Nocardioideis exalbidus</i> sp.nov	ARNr 16S	dépendente de la culture	38
<i>Canoparmelia caroliniana</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	ARNr 16S	Indépendente de la culture	33
<i>Canoparmelia crozalsiana</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> / <i>Serratia marcescens</i>	ARNr 16S	Indépendente de la culture	
<i>Canoparmelia texana</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Serratia marcescens</i> / <i>Pseudomonas stutzeri</i>	ARNr 16S	Indépendente de la culture	
<i>Parmotrema sancti-angeli</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Serratia marcescens</i> / <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	ARNr 16S	Indépendente de la culture	
<i>Parmotrema tinctorum</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Serratia marcescens</i> / <i>Pseudomonas</i> sp <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> / <i>Pantoea</i> sp	ARNr 16S	Indépendente de la culture	
Récoltés à Tokyo	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Leifsonia lichenia</i> sp. nov.	ARNr 16S	dépendente de la culture	36
<i>Lecanora fuscobrunnea</i> <i>Umbilicaria decussata</i> <i>Usnea antarctica</i> <i>Xanthoria elegans</i>	<i>Actinobacteria</i> <i>Proteobacteria</i> <i>Firmicutes</i> <i>Deinococcus-thermus</i>	<i>Actinobacteria</i>	30 isolats bactériens	ARNr 16S	dépendente de la culture	107



**Tableau 21 (suite) : Récapitulatif des études reportant des espèces bactériennes associées aux lichens selon les espèces lichéniques et le type de méthodes utilisées**

<i>Cladonia cristatella</i> <i>Cladonia</i> <i>cryptochlorophaea</i> <i>Cladonia peziziformis</i> <i>Cladonia subtenuis</i> <i>Flavoparmelia caperata</i> <i>Parmotrema perforatum</i> <i>Peltigera phyllidiosa</i> <i>Lasallia pensylvanica</i> <i>Umbilicaria mammulata</i>	<i>Acidobacteria</i> <i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i> <i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Acetobacteraceae</i> <i>Brucellaceae</i> <i>Methylobacterium</i>	ARNr 16S	Indépendante de la culture	32
<i>Lobaria pulmonaria</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderia</i> sp. Bactéries fixatrices d'azote	SSCP ; ARNr 16S et FISH/CLSM	Indépendante de la culture	28
<i>Cetraria aculeata</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	-	clonage	dépendante de la culture	108
<i>Peltigera membranacea</i>	<i>Proteobacteria</i> <i>Actinobacteria</i> <i>Bacterioidetes</i>	<i>Alphaproteobacteria</i> <i>Betaproteobacteria</i>	-	pyroséquençage	Indépendante de la culture	100
<i>Arthrorhaphis citrinella</i> , <i>Baeomyces placophyllus</i> <i>Beomyces rufus</i> <i>Icmadophila ericetorum</i> <i>Psora decipiens</i> <i>Trapeliopsis granulosa</i>	<i>Proteobacteria</i> <i>Acidobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	-	FISH/CLSM	Indépendante de la culture	34
<i>Cladonia arbuscula</i>	<i>Proteobacteria</i> <i>Actinobacteria</i> <i>Firmicutes</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	-	FISH/CLSM	Indépendante de la culture	26
<i>Cetraria islandica</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	-	FISH/CLSM	Indépendante de la culture	30
25 espèces lichéniques	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	337 isolats bactériens	Acide Gras et empreintes moléculaires	dépendante de la culture	27

Légende : lichens terrestres (marron) ; lichens marins (bleu) ; lichens mixtes (terrestres, marins, tropicales ou aussi bien polaires) (vert) ; lichens polaires (violet) et lichens non identifiés (blanc)

Ainsi, parmi les 77 espèces lichéniques répertoriées ci-dessus, 51% sont des lichens récoltés en zones terrestres (Autriche, Colorado, Brésil, Espagne, Allemagne ou Virginie), 36% correspondent à des espèces lichéniques qui peuvent être aussi bien récoltées en zones terrestres, marines, polaires que tropicales, 5% sont des lichens polaires (Alaska), 5% correspondent à des espèces lichéniques non identifiées (récoltées au Japon) et enfin 1.3%, soit une espèce lichénique a été collectée dans un environnement marin (*Hydropunctaria maura*). Par conséquent, très peu d'études reportent des informations sur la diversité bactérienne cultivable et/ou non cultivable associée à des lichens marins/maritimes (Tableau 21). Et, de manière générale, peu d'études utilisent des approches dépendantes de la culture pour décrire les communautés bactériennes cultivables au sens large (e.g. pas uniquement une seule espèce) même si cette diversité est très éloignée de la diversité bactérienne réelle. En effet, les études réalisées sont basées sur des techniques moléculaires permettant de mettre soit (1) en évidence le polymorphisme à partir d'ADN ou d'ARN natif (SSCP) ou dénaturé (DGGE), soit (2) à partir de régions très polymorphiques du gène de l'ADNr non codantes (ITS), soit (3) à partir de l'ARNr 16S, soit (4) par clonage, soit (5) par pyroséquençage, soit (6) sur des empreintes moléculaires ou soit (7) par approches microscopiques (FISH/CLSM).

<sup>104</sup>Cheenpracha, S., Vidor, N. B., Yoshida, W. Y., Davies, J., and Chang, L. C. (2010) *Journal of Natural Products* 73, 880–884.

<sup>105</sup>Motohashi, K., Takagi, M., Yamamura, H., Hayakawa, M., and Shin-ya, K. (2010) *Journal of Antibiotics* 63, 545–548.

<sup>106</sup>Williams, D. E., Davies, J., Patrick, B. O., Bottrill, H., Tarling, T., Roberge, M., and Andersen, R. J. (2008) *Organic Letters* 10, 3501–3504.

<sup>107</sup>Selbmann, L., Zucconi, L., Ruisi, S., Grube, M., Cardinale, M., and Onofri, S. (2009), *Polar Biology* 33, 71–83.

<sup>108</sup>Printzen, C., Fernández-Mendoza, F., Muggia, L., Berg, G., Grube, M. (2012) *FEMS Microbiology Ecology* 82, 316–325.

Ainsi, diverses méthodes basées sur différentes approches pouvant être complémentaires, mais non usitées au cours d'une même étude sur une même espèce lichénique, ont été utilisées pour mettre en évidence la diversité bactérienne associée à des lichens.

D'autre part, par ces différentes méthodes mises en place, environ la moitié (10/21) des études décrit la présence d'*Actinobacteria* associées aux lichens mais en faible proportion en terme d'abondance dans les cas d'approches non ciblées (indication en rouge, **Tableau 21**).

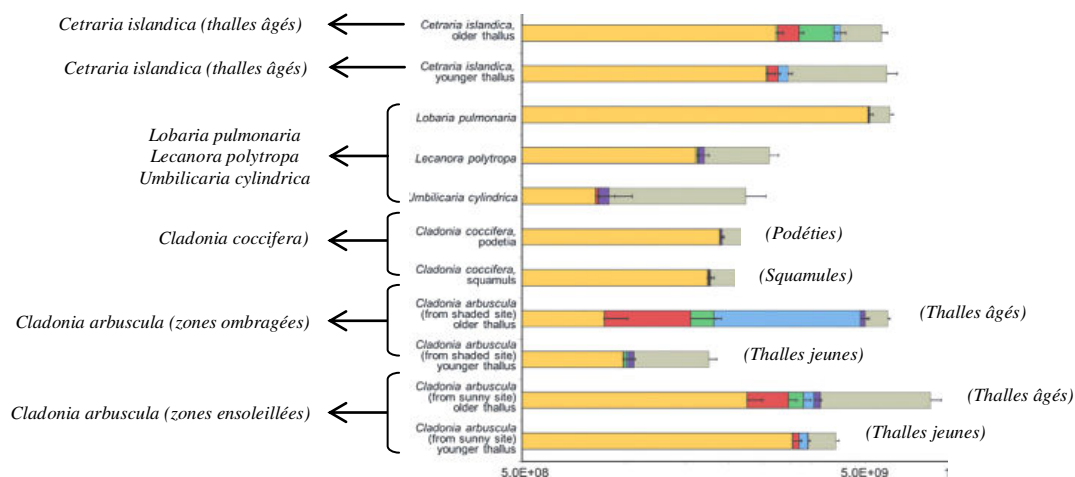
Enfin, parmi ces 21 études reportées, seulement une porte sur l'étude des communautés bactériennes cultivables associées à des lichens polaires.<sup>107</sup> Aucune étude ne concerne par contre les **communautés bactériennes cultivables associées à des lichens marins/maritimes**.

Par l'étude des communautés bactériennes associées aux lichens, de nouvelles espèces bactériennes ont également été découvertes.<sup>35-38,104-106</sup> Trois nouvelles souches d'*Actinobacteria* ont été isolées d'un lichen non identifié récolté au Japon : *Schumannella luteola* sp. nov., *Leifsonia lichenia* sp. nov et *Nocardioides exalbidus* sp. nov.<sup>35,36,38</sup> Deux nouvelles souches de *Streptomyces* ont été isolées de deux lichens du genre *Cladonia* (*Cladonia gracilis* : souche L-44 et *C. uncialis* : *Streptomyces uncialis*)<sup>37,105,106</sup> et d'autres espèces de lichens récoltés au Japon (souches RI104 - LiC106 et RI104 - LiB101).<sup>104</sup>

## 2.2. Facteurs environnementaux et rôles dans la symbiose lichénique

### 2.2.1. Facteurs environnementaux

Les lichens hébergent donc une communauté bactérienne non négligeable mais son abondance et sa diversité sont dépendantes de plusieurs facteurs environnementaux : des facteurs extrinsèques (exposition, substrat, localisation ...) mais également des facteurs intrinsèques (espèce lichénique en considération, âge du thalle, partie du thalle, composition chimique du lichen ...).<sup>39,102</sup> Il a été également reporté que l'acide usnique (un métabolite secondaire abondant au sein de certaines espèces lichéniques et présentant de multiples propriétés biologiques, en l'occurrence, des propriétés antibactériennes), n'influençait pas l'abondance mais uniquement la diversité des communautés bactériennes associées aux lichens.<sup>39,102</sup> En conséquence, les communautés bactériennes associées étaient plus spécifiques. D'autre part, selon les parties du thalle lichénique considérées, une diversité bactérienne différente a été montrée par FISH/CLSM. En effet, les jeunes parties du thalle lichénique de *Lobaria pulmonaria* étaient dominées par des bactéries de la classe des *Alphaproteobacteria* tout comme les podéties et les squamules. Au contraire, des thalles lichéniques âgés localisés aussi bien sur des sites ombragés qu'ensoleillés étaient caractérisés par une plus grande diversité : *Actinobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* et voire même des *Deltaproteobacteria* en plus des *Alphaproteobacteria* (**Figure 55**).<sup>102</sup>



**Figure 55 : Proportion de différents phyla bactériens associés à des lichens selon leur localisation au sein du lichen et l'âge du lichen<sup>102</sup>**

**Légende :** orange : Alphaproteobacteria, jaune : Firmicutes, rouge : Actinobacteria, vert : Gammaproteobacteria, bleu : Betaproteobacteria, violet: Deltaproteobacteria et gris : autres espèces bactériennes

D'un autre côté, la localisation géographique des lichens a permis de mettre en évidence des similarités de composition entre les communautés bactériennes associées à des lichens de même environnement. En effet, le lichen *Cetraria aculeata* (lichen fruticuleux terrestre avec une répartition bipolaire et montagneuse) récolté au sein d'un même environnement a montré des communautés bactériennes d'*Alphaproteobacteria* proches les unes des autres. Mais ces dernières étaient plus éloignées de celles associées à ces mêmes lichens présents à des altitudes plus élevées que celles des régions tempérées.<sup>108</sup>

### 2.2.2. Rôles et implications dans la symbiose lichénique

Les communautés bactériennes associées aux lichens se révèlent être abondantes et diversifiées mais leurs implications fonctionnelles au sein de la symbiose lichénique restent encore à ce jour largement inexpliquées et inexplorées. Cependant, certaines hypothèses ont été proposées. En effet, de nombreux rôles potentiels allant du recyclage des nutriments à la protection vis-à-vis d'autres organismes par la production de métabolites bioactifs (uncialamycine, aminocoumarines, angucyclines, buténolides ...) ont été suggérés. Il a été également proposé que ces communautés bactériennes soient des agents pathogènes.<sup>37,100,104,105</sup>

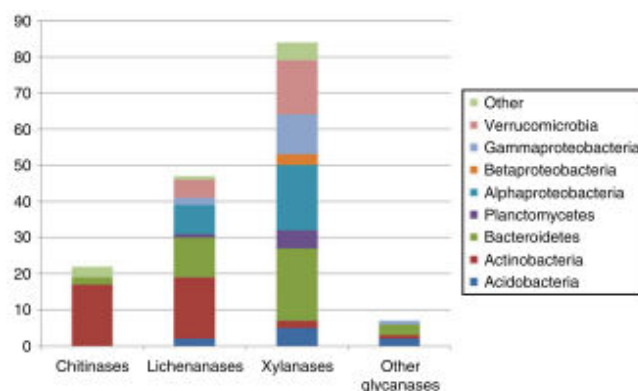
Des études protéomiques<sup>101</sup> ont montré la présence de protéines impliquées dans le transport des acides aminés, des nucléotides, des coenzymes et des lipides au sein de bactéries associées aux lichens et aux champignons.



En conséquence, la réaffectation des ressources aux lichens pourrait également être assurée par les bactéries, notamment dans l'apport d'azote aux lichens à algues vertes ou aux cyanolichens en conditions de déficience en azote.<sup>109</sup> Cette capacité de fixation d'azote peut être évaluée par la présence du gène *nifH* (indiquant la présence de nitrogénase). Le gène *nifH* est trouvé au sein des bactéries fixatrices d'azote et des bactéries symbiotiques associées à diverses plantes comme des *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* et des *Firmicutes*<sup>31</sup> ainsi que certaines *Actinobacteria*.<sup>110</sup>

D'autres fonctions au sein du lichen ont été décrites. Les communautés bactériennes associées pourraient par exemple faciliter la mobilisation de la biomasse en dégradant une partie du thalle lichénique. Ceci a été mis en évidence par des études fonctionnelles où la fraction bactérienne cultivable a indiqué la présence d'une large gamme de protéines à activités lytiques (chitinolyse, glucanolyse et protéolyse) et d'hormones et peuvent mobiliser des phosphates et influencer la croissance lichénique.<sup>29,31,33</sup>

La chitine constitue une part importante de la biomasse des lichens. En l'occurrence, pour des lichens du genre *Peltigera* sp., elle représente environ 13% de la paroi cellulaire. Les quelques chitinases A connues sont presque exclusivement d'origine actinobactérienne. Les *Actinobacteria* peuvent être le principal groupe constituant les communautés bactériennes associées au genre *Peltigera* capable de métaboliser (dégrader) ce composant des parois cellulaires du mycobionte, en tenant compte que les *Actinobacteria* sont particulièrement associées aux thalles lichéniques sénescents. De plus, plusieurs glycosyl-hydrolases de la classe 16 des enzymes (lichenanases, laminarinases, etc...) et de la classe 43 (xylanases, etc...) et certaines cellulases (classe d'enzymes 5 et 6) ont été trouvées. La plupart des enzymes de la classe 43 étaient des xylanases correspondant à des enzymes de *Verrucomicrobia* ou de *Bacteroidetes*. La classe d'enzyme 16 (glycosyl hydrolases) de *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* et *Actinobacteria* étaient également présents dans le métagénome ainsi que des séquences très similaires à des cellulases d'*Actinobacteria*, de *Bacteroidetes* et d'*Acidobacteria*<sup>100</sup> (Figure 56).



**Figure 56 :** Analyses fonctionnelles partielles des procaryotes de *Peltigera membranacea*<sup>100</sup>

<sup>109</sup>Ellis, C. J., Crittenden, P. D., Scrimgeour, C. M., Ashcroft, C. J. (2005) *New Phytology* 168, 423–34.

<sup>110</sup>Gtari, M., Ghodhbane-Gtari, F., Nouioui, I., Beauchemin, N., Tisa, L. S. (2012) *Archives of Microbiology* 194, 3–11.

Bien que les essais *in vitro* fournissent des indications précieuses sur les fonctions potentielles des communautés bactériennes associées aux lichens, leurs rôles pour l'ensemble de la symbiose restent encore inexplorés et ne doit pas également être surestimés en raison de possibles écarts entre les fractions cultivables et non cultivables.<sup>100</sup>

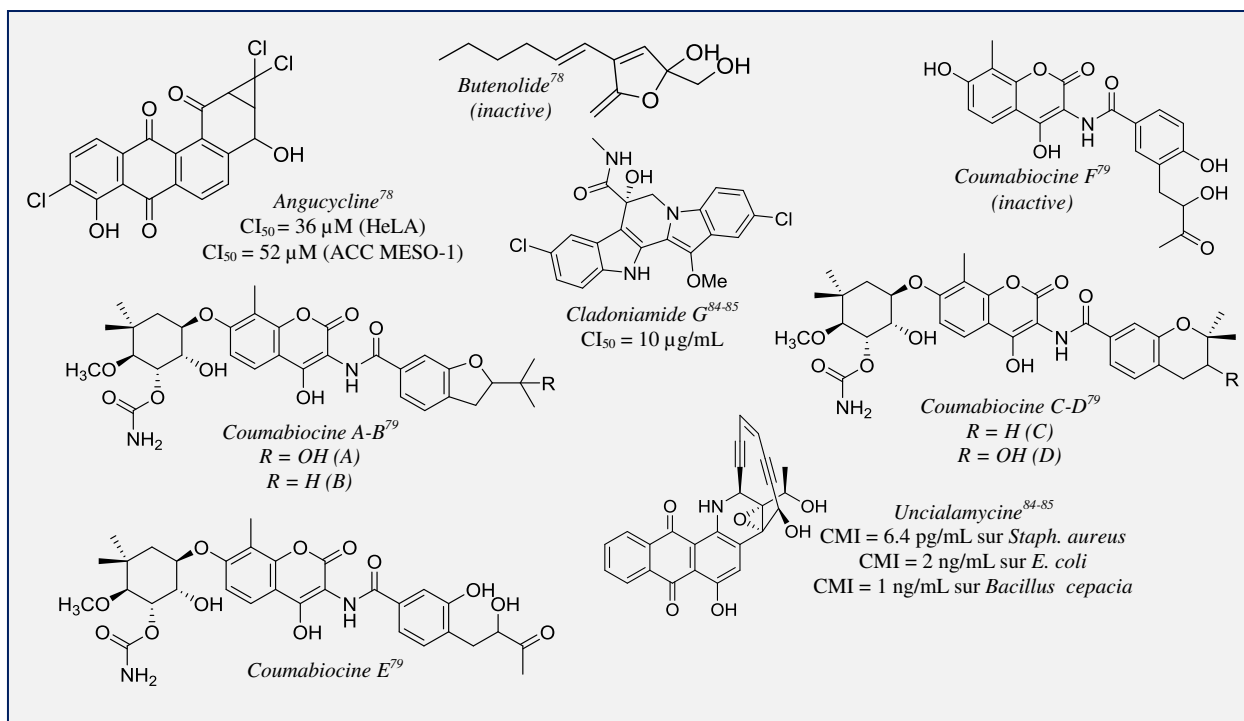
### 2.3. Métabolites produits par des bactéries associées aux lichens et activités biologiques

Parmi les souches bactériennes associées aux lichens, quelques unes d'entre elles ont fait l'objet d'une étude chimique et certains métabolites ont été découverts (**Figure 57**).

L'uncialamycine, une ènediynes<sup>37,111</sup>, présentant des propriétés antibactériennes vis-à-vis de pathogènes humains (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Burkholderia cepacia*) ainsi que des propriétés antitumorales et des cladoniamides A-G, montrant des propriétés cytotoxiques sur lignées cellulaires MCF-7 ont été isolés de *Streptomyces uncialis* associé à *Cladonia uncialis*.<sup>37,106</sup> De plus, une angucycline ayant des propriétés cytotoxiques (lignées cellulaires HeLa (métastase du cancer du col de l'utérus) et sur les lignées cellulaires ACC MESO-1 (mésothélium humain)) et des propriétés antibactériennes vis-à-vis de *Micrococcus luteus* (diamètre d'inhibition de 11 mm à 25 µg déposés)) et une butenolide (inactive) ont été isolées d'un *Streptomyces* sp. associé à un lichen non identifié récolté au Japon<sup>104</sup>. Enfin, six aminocoumarines (coumabiocines A-E) montrant des propriétés antibactériennes vis-à-vis de *Streptomyces* E85 (diamètre d'inhibition entre 10-15 mm à 20 µg déposés) ont été également isolées d'un *Streptomyces* sp. associé à *Cladonia gracilis*.<sup>105</sup> Ainsi, quelques métabolites ont été isolés à partir de communautés bactériennes associées aux lichens dont certaines présentent des structures originales (l'uncialamycine, une ènediynes) leur conférant des propriétés biologiques remarquables et très intéressantes (antibactériennes et comme scindant de l'ADN).

---

<sup>111</sup>Jean, M., Tomasi, S., van de Weghe, P. (2012) *Organic & Biomolecular Chemistry* 10, 7453–6.



**Figure 57 : Métabolites isolés de souches bactériennes associées à des lichens**

Ainsi, la mise en évidence de nouvelles espèces bactériennes et la caractérisation structurale de quelques métabolites bioactifs isolés à partir de souches bactériennes associées à divers lichens suggèrent un potentiel non négligeable de ces organismes pour la recherche de nouvelles molécules bioactives.

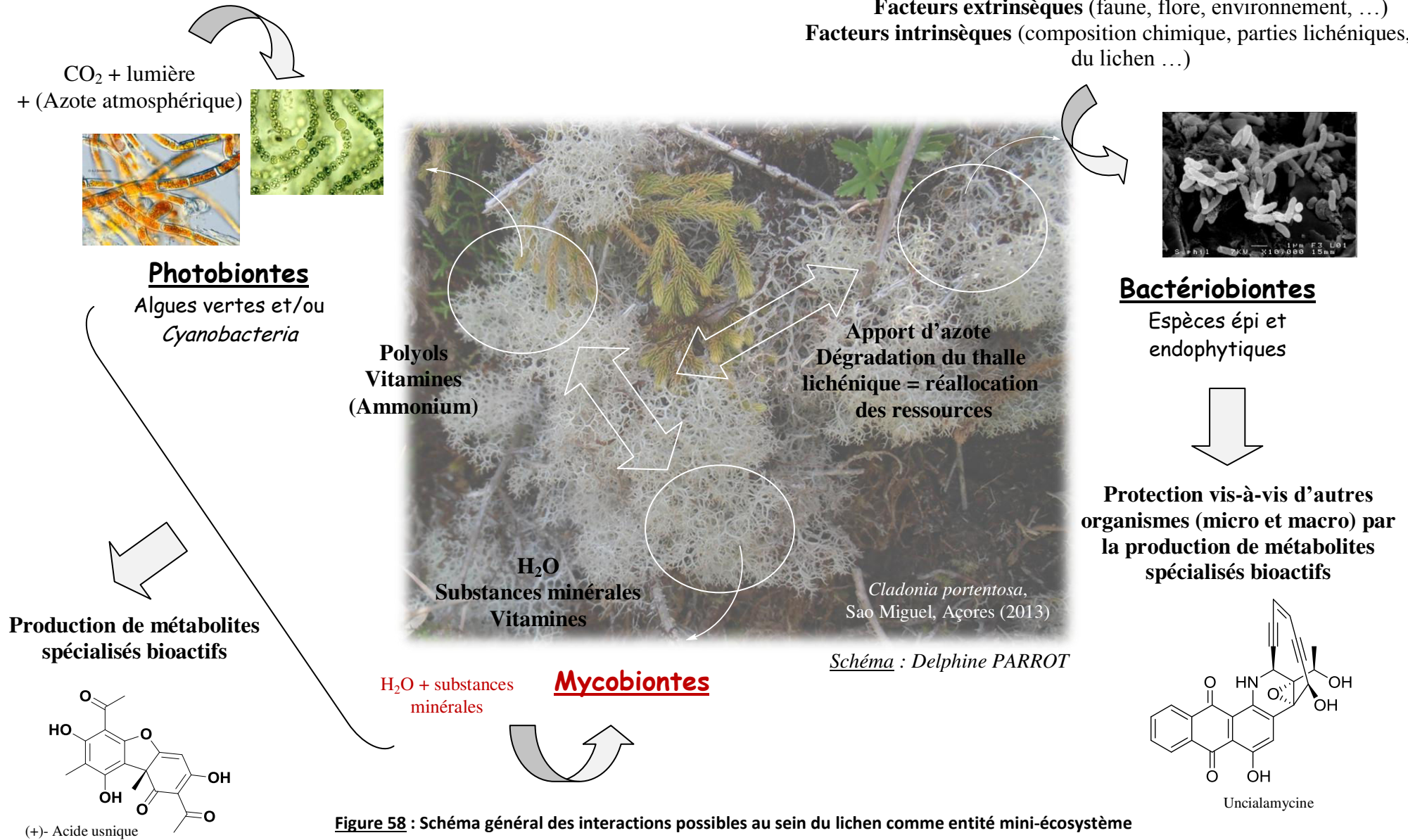
### 3. Conclusion

Les lichens hébergent une riche communauté bactérienne. Leur abondance et diversité sont cependant sous l'influence de nombreux facteurs environnementaux et lichéniques. De manière générale, il en résulte une forte densité d'*Alphaproteobacteria*. D'autre part, les interconnexions entre les différents partenaires symbiotiques (photobiontes, mycobiontes et bactériobiontes) restent encore inexplorées même si certaines hypothèses ont été soulevées (**Figure 58**).

A l'heure actuelle, très peu d'études ont porté sur la diversité cultivable de ces communautés bactériennes associées aux lichens et par conséquent, très peu de métabolites spécifiques bioactifs ou non (11 seulement) ont été isolés. De ce fait, les lichens constituent une niche bactérienne importante et intéressante pour la recherche de nouvelles souches bactériennes et de molécules bioactives.

**Facteurs extrinsèques** (faune, flore, environnement, ...)

**Facteurs intrinsèques** (composition chimique, parties lichéniques, âges du lichen ...)



**Figure 58 : Schéma général des interactions possibles au sein du lichen comme entité mini-écosystème**



*PARTIE 2 : Communautés  
bactériennes associées à quatre  
lichens: diversité bactérienne et  
études chimiques.*

---

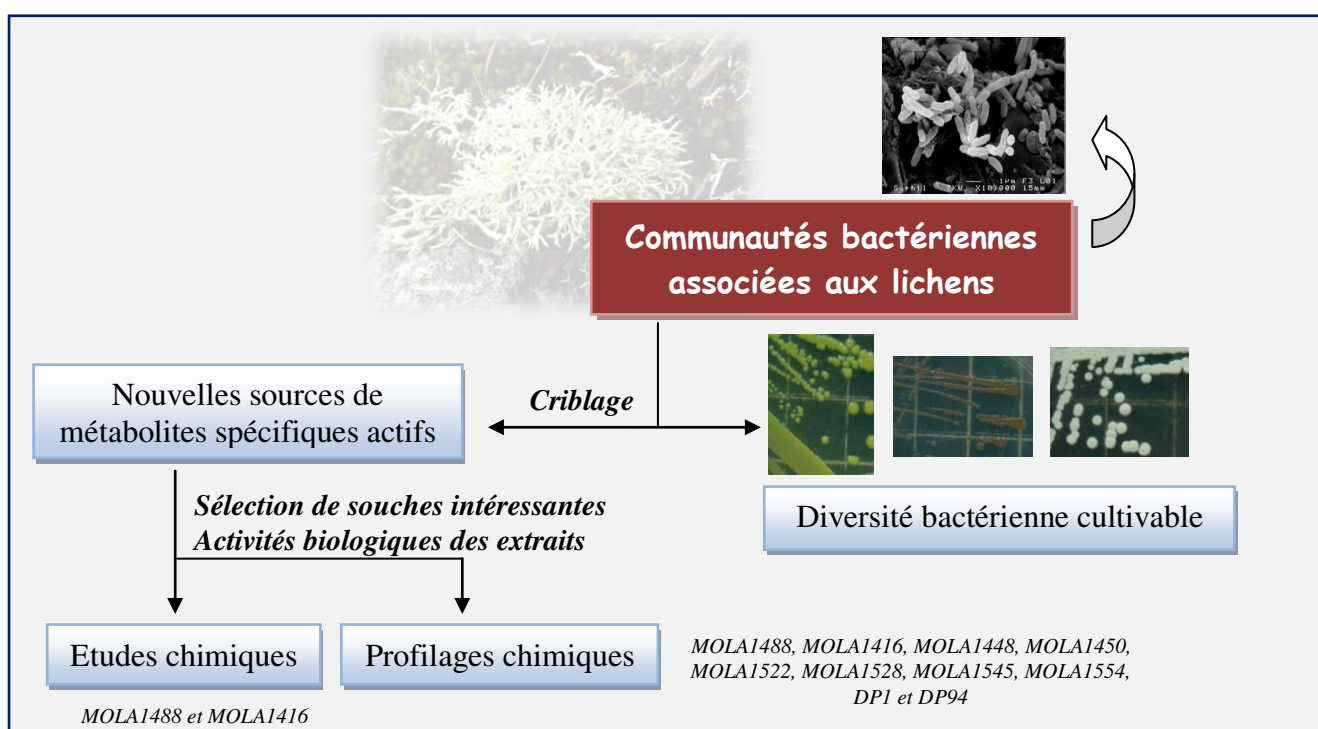


## 1. Objectifs de l'étude bactériochimique

Suite au chapitre 2 - Partie 1, les communautés bactériennes associées aux lichens, il en résulte un intérêt particulier d'étudier ces communautés bactériennes cultivables aussi bien en termes de diversité qu'en termes de potentiels chimiques (métabolites spécifiques et propriétés biologiques associées).

Tout d'abord la diversité cultivable des communautés bactériennes sera évaluée à partir de quatre espèces lichéniques : deux marines (*Lichina confinis* et *L. pygmaea*), une maritime (*Rocella fuciformis*) et également une espèce lichénique terrestre associée à une cascade (*Collema auriforme*). Les similarités et les différences de la diversité bactérienne cultivable associées à ces quatre lichens seront mises en évidence ainsi que l'influence des conditions de culture sur cette diversité. Par la réalisation d'un criblage (génétique : PKS I et PKS II et/ou antibactérien), les potentiels biologiques de l'ensemble des souches seront déterminés.

Deux souches bactériennes intéressantes : MOLA1488, *Streptomyces cyaneofuscatus* (potentiel chimique important) isolée de *Lichina confinis* et MOLA1416, *Hoeflea* sp. (nouvelle espèce, 91% de similarité pour le gène de l'ARNr 16S avec *Hoeflea phototrophica*) isolée de *Lichina pygmaea* ont été sélectionnées pour une étude chimique la plus complète possible (identifications structurales et propriétés biologiques). D'autre part, dix souches bactériennes dont MOLA1488, MOLA1416 ont été soumises à des évaluations biologiques et à un profilage chimique par LC-MS/MS analysé par la réalisation de « Molecular Network » afin (1) de mettre en évidence des similarités chimiques entre différentes espèces bactériennes associées à diverses espèces lichéniques et (2) d'évaluer leurs potentiels biologiques (**Figure 59**).



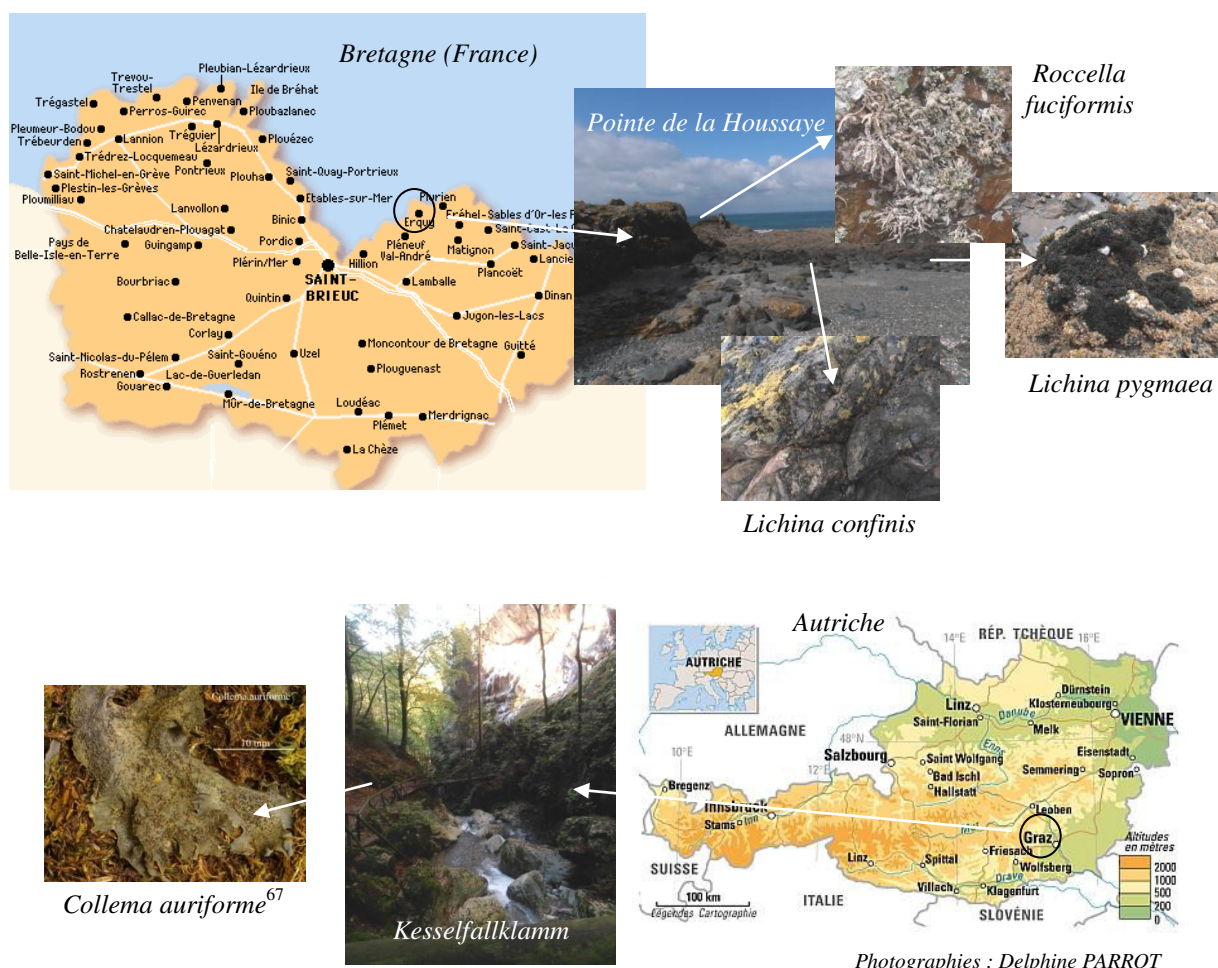
**Figure 59** : Schéma général de la partie 2 (Chapitre 2) - Communautés bactériennes associées : diversité bactérienne et études chimiques



## 2. Résultats

### 2.1. Espèces lichéniques : Récolte

Quatre espèces lichéniques ont été récoltées. Trois espèces (*Roccella fuciformis*, *Lichina confinis* et *L. pygmaea*) ont été collectées à la Pointe de la Houssaye (Erquy, Bretagne, France) par Sophie TOMASI et Delphine PARROT en Avril 2012. Une espèce (*Collema auriforme*) a été collectée dans la région de Graz à Kesselfallklamm (Autriche) par Martin GRUBE et Delphine PARROT en Novembre 2012 (**Figure 60**). Les échantillons ont été collectés de manière aseptique et introduits dans des sacs stériles puis soumis à différentes étapes d'isolement. Le stockage est réalisé à 4°C (dans la glace) sur les lieux de récoltes puis à - 20°C au laboratoire.



**Figure 60** : Caractéristiques des lieux de récolte des quatre espèces lichéniques étudiées

Les récoltes ont été effectuées en zones marine et maritime en Bretagne (*Lichina confinis*, *L. pygmaea* et *Roccella fuciformis*) et également dans les terres, proche d'une cascade, en Autriche (*Collema auriforme*). Par conséquent, ces deux zones de récoltes constituent des environnements différents : une associée à de l'eau de mer et l'autre associée à de l'eau douce.

## 2.2. Espèces lichéniques : Isolement

Les lichens ont été premièrement soumis à un lavage rapide sur le terrain à l'eau stérile (élimination des bactéries non associées). Ensuite, un lavage avec soit de l'eau de mer stérile (*L. confinis*, *L. pygmaea* et *R. fuciformis*) soit avec avec une solution de NaCl 0.85% / peptone issus de caséine 1% stérile a été réalisé. Cette première étape constitue l'extrait de lavage, pouvant être assimilé aux communautés bactériennes epilichéniques. Suite à cela, ces mêmes lichens ont été broyés et associés aux mêmes solutions respectives. Ainsi, cette deuxième étape constitue l'extrait de l'homogénat, pouvant être assimilé aux communautés bactériennes endolichéniques. Par la suite, les différents extraits (lavages et homogénats) ont été étalés sur deux milieux pour les lichens marins/maritimes réalisés à Banyuls/Mer: MA (Marine Agar) et AIA (Actinomycetes Isolation Agar) et uniquement sur un milieu pour le lichen terrestre réalisé en Autriche: ISP2 (International *Streptomyces* Project 2). A l'ensemble de ces milieux de cultures utilisés, de l'acide naladixique a été ajouté afin de sélectionner plus préférentiellement les *Actinobacteria* associées du fait de leur potentiel chimique connu.

## 2.3. Diversité des communautés bactériennes associées

### 2.3.1. Approche dépendante de la culture : diversité des communautés bactériennes associées cultivables

A l'issue des récoltes, les échantillons ont été traités comme décrit dans la partie Matériels & Méthodes et de nombreuses souches bactériennes ont été isolées et identifiées sur la base du gène de l'ARNr 16S par comparaison avec les souches référencées dans la base de données EzTaxon server.<sup>112</sup> Les identifications correspondent à la plus grande similarité (%) avec des espèces connues. Lorsque ce pourcentage est inférieur ou égal à 96%, il s'agit probablement de nouvelles espèces voire de nouveaux genres bactériens.

Ainsi, à travers de l'étude des communautés bactériennes associées à ces quatre espèces lichéniques, 247 souches bactériennes représentant 95 espèces différentes ont été isolées et identifiées (**Figure 61** et **Annexe 10**). Trois phyla bactériens (*Proteobacteria*, *Firmicutes* et *Actinobacteria*) ont été mis en évidence au sein des quatre lichens hôtes. Cependant, leurs proportions varient selon le lichen considéré dans les conditions utilisées, c'est-à-dire en présence d'acide nalidixique. Une homogénéité entre les différents phyla a été mise en évidence au sein de *Lichina pygmaea* (35% d'*Actinobacteria* et de *Proteobacteria* et 35% de *Firmicutes*). Les autres espèces lichéniques sont dominées par un ou deux phyla principalement : pour *L. confinis* par les phyla des *Proteobacteria* (58%) et celui des *Actinobacteria* (40%) ; pour *Rocella fuciformis* par les *Actinobacteria* (94%) et enfin *Collema auriforme* est dominé par le phylum des *Proteobacteria* (72%).

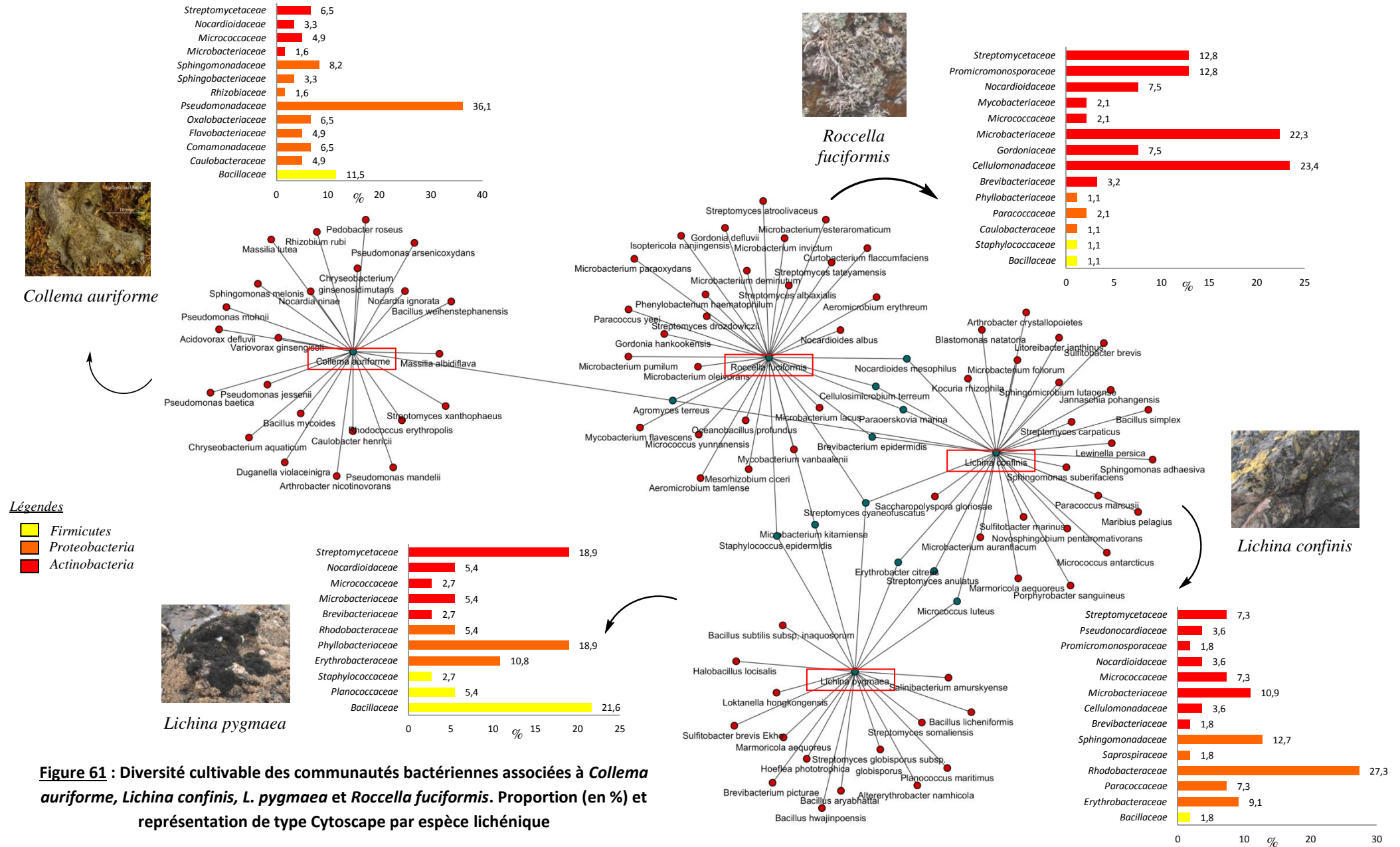
<sup>112</sup>Kim, O.-S., Cho, Y.-J., Lee, K., Yoon, S.-H., Kim, M., Na, H., Park, S.-C., Jeon, Y. S., Lee, J.-H., Yi, H., Won, S., Chun, (2012) *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65, 716–721.

En allant plus dans le détail de cette diversité bactérienne, on a pu observer la présence de famille dominante et spécifique pour chacun de ces quatre lichens (**Figure 61**). Tout d'abord, un nombre similaire de familles bactériennes a été mise en évidence pour ces quatre lichens (14 familles pour *L. confinis* et *R. fuciformis* ; 13 familles pour *C. auriforme* et 11 familles pour *L. pygmaea*). D'autre part, *L. confinis* est dominé par des espèces appartenant aux *Rhodobacteraceae* (*Proteobacteria*) (27.3%) alors que *L. pygmaea* est dominé par la famille des *Bacillaceae*, (*Firmicutes*) (21.6%) alors que *Collema auriforme* est dominé par la famille des *Pseudomonadaceae* (*Proteobacteria*) (36.1%). *Rocella fuciformis* est quant à lui caractérisé par la famille des *Cellulomonadaceae* (23.4%) et des *Microbacteriaceae* (22.3%) (*Actinobacteria*). Ceci montre que deux espèces lichéniques du même genre et d'un environnement proche, présentent probablement (car pas de répliquat réalisé) une communauté bactérienne cultivable qui leur ait propre.

Cependant, certaines espèces bactériennes ont été trouvées au sein d'au moins deux espèces lichéniques (**Figure 61**). Tout d'abord, *Agromyces terreus* a été mis en évidence aussi bien au sein de *C. auriforme*, *L. confinis* que de *R. fuciformis* et *Streptomyces cyaneofuscatus* a été isolé et identifié au sein des trois lichens marins/maritimes.

D'autre part, trois espèces bactériennes (*Streptomyces anulatus*, *Micrococcus luteus* et *Erythrobacter citreus*) sont communes entre les deux espèces du genre *Lichina*, quatre entre *L. confinis* et *R. fuciformis* (*Nocardioide mesophilus*, *Cellulosimicrobium terreum*, *Brevibacterium epidermidis* et *Paraoerskovia marina*) et deux espèces sont communes entre *L. pygmaea* et *R. fuciformis* (*Staphylococcus epidermidis* et *Microbacterium kitamiense*).

## Chapitre 2 - PARTIE 2 - Communautés bactériennes associées : diversité bactérienne et études chimiques.





Du fait du potentiel chimique connu et intéressant des *Actinobacteria* (45% de toutes les molécules bioactives décrites), nous avons utilisé l'acide nalidixique afin de préférentiellement sélectionner celles associées aux lichens marins/maritimes (*R. fuciformis*, *L. confinis* et *L. pygmaea*) ou au lichen terrestre (*C. auriforme*). On peut ainsi souligner l'intérêt de certaines familles d'*Actinobacteria* pour des applications biotechnologiques, en l'occurrence des espèces appartenant aux familles des *Promicromonosporaceae*, *Pseudonocardaceae*, *Streptomycetaceae* et *Nocardiodaceae*. Une analyse se basant sur le regroupement des OTU des Actinobactéries des lichens marins/maritimes ayant au moins 98.5% d'identité a été réalisée. Dans ces analyses, la présence et l'absence des OTU dans chaque fraction (homogénat et lavage) ainsi que le milieu d'isolement (AIA et MA) ont été pris en compte.

Une méthode basée sur les distances phylogénétiques (de type Unifrac)<sup>113</sup> a été utilisée sur l'ensemble des séquences des souches isolées. Celles isolées de *Collema auriforme*, du fait de l'utilisation d'un milieu de culture différent (ISP2) a été utilisé comme groupe extérieur (« outgroup ») dans les analyses (**Figure 62**). Il est important de souligner que cette **Figure 62** est un reflet de la diversité au sein des phyla plutôt que le reflet du nombre de souches bactériennes isolées.

Ainsi, à partir de l'analyse Unifrac, les *Actinobacteria* se sont révélèrent moins différenciables en fonction de l'espèce lichénique ou de leur localisation (c'est-à-dire : homogénat ou lavage) mais plus en fonction du milieu de culture utilisé. Les communautés associées aux espèces du genre *Lichina* ont montré un regroupement en fonction des milieux d'isolement. Au contraire, les communautés bactériennes associées à *Rocella fuciformis* ont montré un regroupement en lien avec l'espèce lichénique (regroupement au sein d'un même nœud), à l'exception des communautés bactériennes issues de l'homogénat et isolées sur le milieu MA. Ainsi, trois groupes sont mis en évidence : les communautés bactériennes isolées sur milieu MA, celles isolées sur AIA et celles associées à *Collema auriforme* (**Figure 62**).

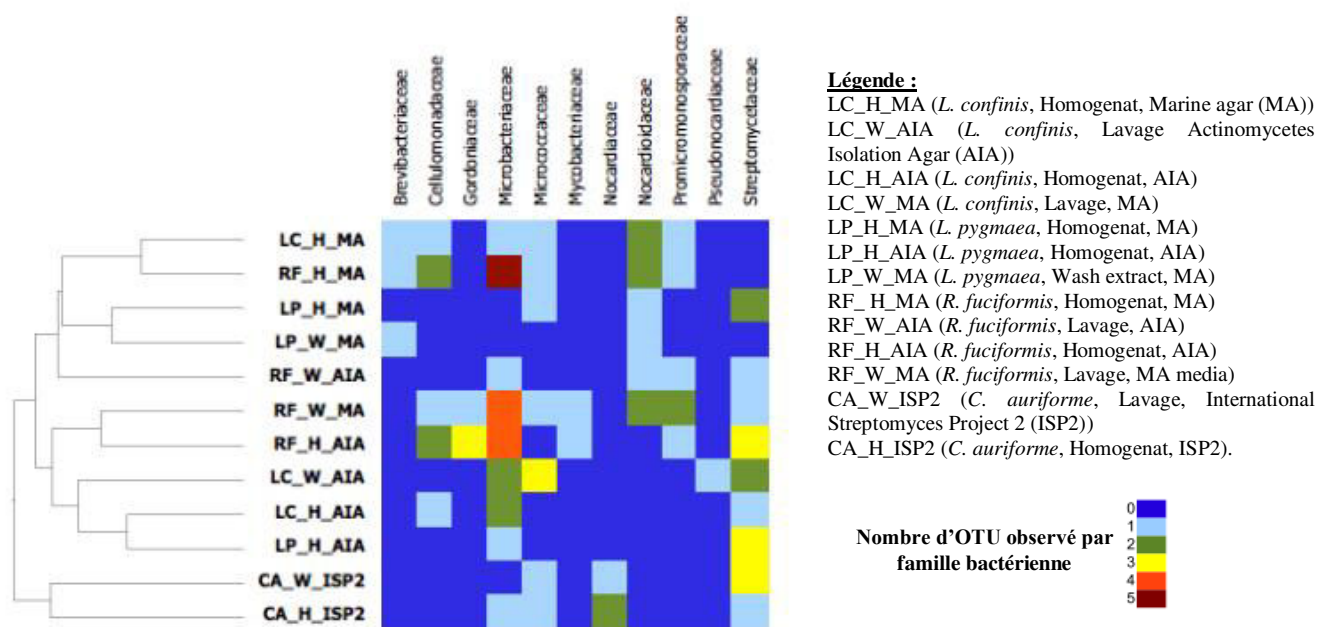
Certaines familles bactériennes ont été isolées spécifiquement à partir d'un milieu de culture : *Nocardiodaceae*, *Brevibacteriaceae* et en plus faible proportion *Promicromonosporaceae* sur le milieu MA alors que *Pseudonocardiodaceae*, *Streptomycetaceae* et *Gordoniaceae* ont été isolés principalement à partir du milieu AIA. Cependant, quelques familles de bactéries associées à ces espèces lichéniques marines/maritimes ne se sont pas révélées être milieux dépendant, comme c'est le cas des *Cellulomonadaceae*, *Microbacteriaceae*, *Micrococcaceae* et *Mycobacteriaceae*.

Lorsque l'on s'intéresse à leur localisation (homogénat ou lavage) on observe une répartition des communautés bactériennes au sein du thalle lichénique (épi et/ou endolichéniques). En effet, certaines familles bactériennes ont été isolées à partir de l'homogénat (*Cellulomonadaceae*, *Gordoniaceae*, *Microbacteriaceae* et *Streptomyces*) tandis que *Pseudonocardiaceae* n'a été isolé qu'à partir du lavage. D'un autre côté, les espèces appartenant aux familles des *Brevibacteriaceae*,

<sup>113</sup>Lozupone, C., and Knight, R. (2005) *Applied and Environmental Microbiology* 71, 8228–8235.

*Micrococcaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Nocardiaceae* et *Promicromonosporaceae* ont été isolées à la fois de l'homogénat et du lavage (**Figure 62**).

Ainsi, l'homogénat a montré une plus grande diversité par rapport à celle du lavage. En conséquence, certaines communautés bactériennes associées aux lichens semblent montrer une distribution spécifique au sein du thalle lichénique (épilichénique ou endolichénique)



**Figure 62 : Représentation Unifrac et clusters des OTUs observés au sein des familles des *Actinobacteria***

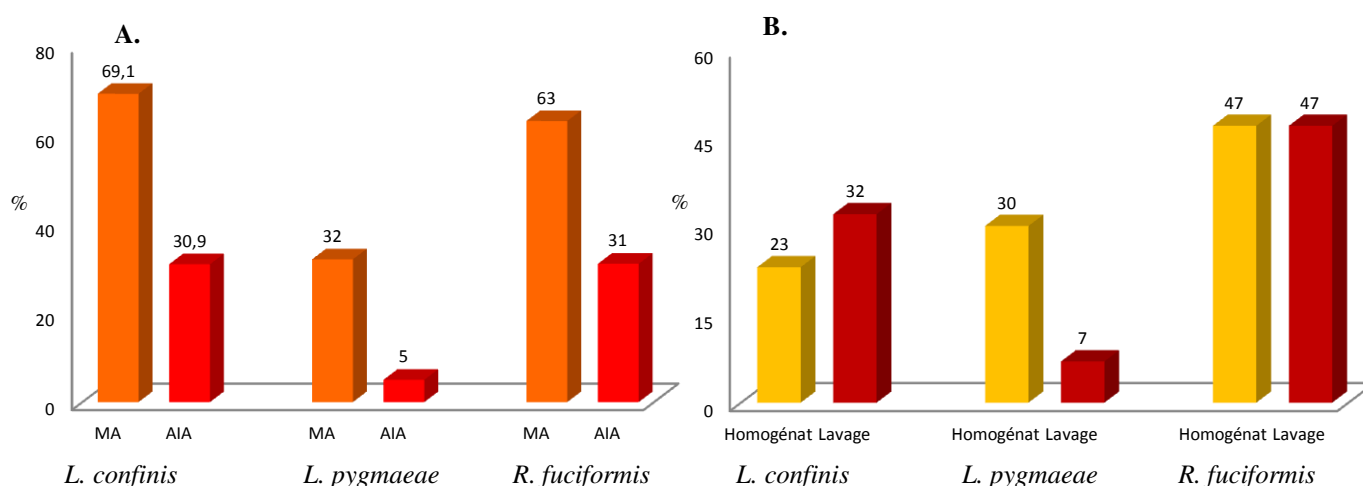
Lorsque l'on s'intéresse maintenant aux genres d'*Actinobacteria* isolés, on constate que le genre *Streptomyces* a majoritairement été isolé de *L. confinis* (18%), de *L. pygmaea* (50%) et de *C. auriforme* (6%). En ce qui concerne *R. fuciformis*, le genre *Paraoskovia* (20%) suivi du genre *Streptomyces* (12%) ont été majoritairement isolés. Ceci montre ainsi une dominance du genre *Streptomyces* au sein des *Actinobacteria* associées à ces quatre lichens.

Ainsi, de nombreuses espèces bactériennes cultivables associées à ces quatre lichens ont été mises en évidence. De plus, au cours de cette étude, 33 différentes espèces bactériennes cultivables associées à *Rocella fuciformis* ont été identifiées alors qu'aucune espèce bactérienne cultivable n'avait été isolée et identifiée lors d'une étude précédente.<sup>29</sup> Ceci peut être expliqué par (1) le lieu et la date de récolte différents et (2) des conditions de cultures utilisées (milieu TY et un milieu dépourvu d'azote).<sup>29</sup>

En effet, les conditions de cultures peuvent fortement influencer la diversité bactérienne cultivable associée. Ainsi, selon le type de milieu de culture utilisé (salé : MA ou non salé : AIA), et selon leur localisation (endolichénique : homogénat ou épilichénique : lavage) la diversité bactérienne cultivable pour les trois espèces lichéniques marines/maritimes n'est pas superposable (**Figure 63**). Ainsi, la plus grande partie des souches cultivables ont été isolées à partir du milieu de culture MA (2

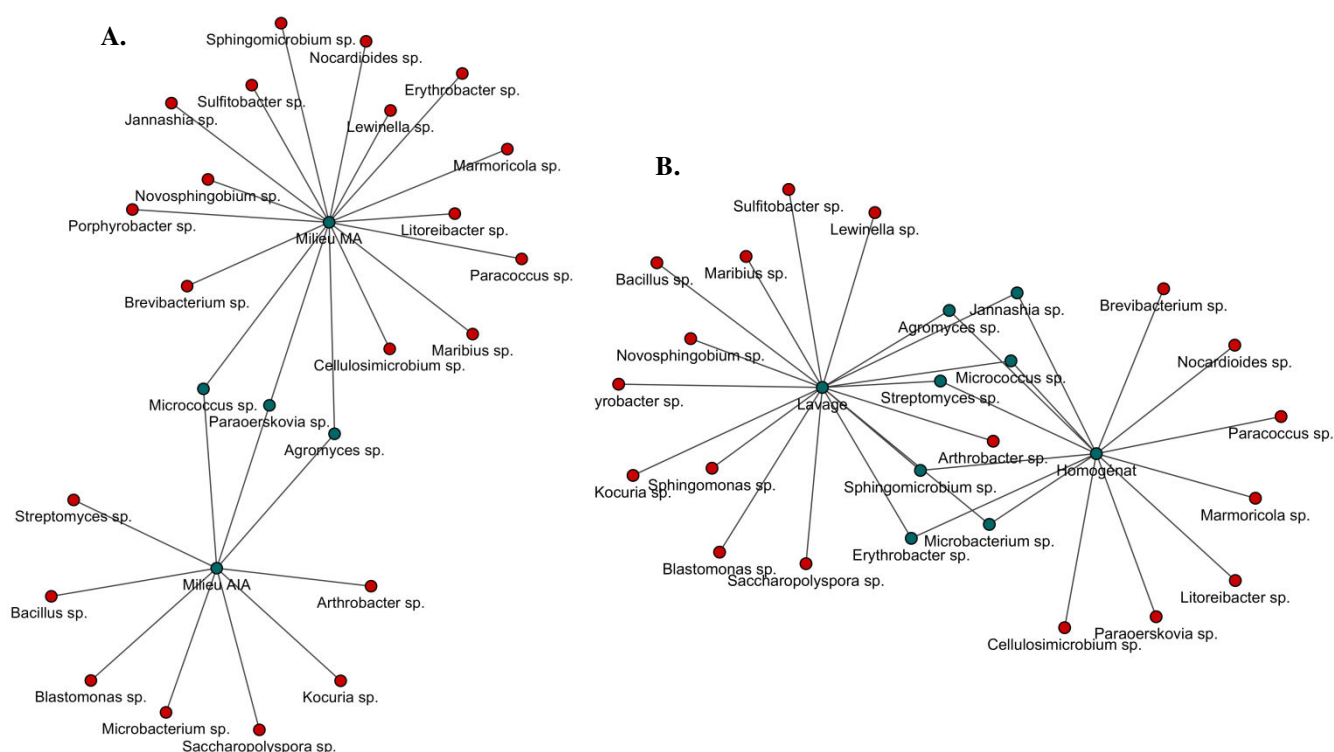
à 6 fois plus importants), alors que la localisation de ces communautés bactériennes cultivables est plus dépendante de l'espèce lichénique hôte. En effet, les souches bactériennes isolées n'ont pas montré de localisation spécifique au sein de *Lichina confinis* et de *Rocella fuciformis* (proportions identiques) alors que pour *L. pygmaea*, une grande partie des souches bactériennes cultivables ont été isolées de l'homogénat (une différence de 4.3% de plus par rapport au lavage). Par conséquent, il semble que les communautés bactériennes cultivables de *L. pygmaea* sont plus endolichéniques alors qu'elles sont aussi bien endo- qu'épilichéniques pour les deux autres espèces lichéniques (**Figure 63**).

De plus, pour un même lichen (*L. confinis*), certains genres n'ont été isolés uniquement que sur l'un ou l'autre des deux milieux de cultures utilisés ou seulement dans l'homogénat ou le lavage (**Figure 64A et B**). Ceci montre bien l'influence des conditions de culture sur la diversité bactérienne cultivable mise en évidence.



**Figure 63 : Pourcentage (%) des genres bactériens isolés selon (A) le milieu de culture et (B) selon leur localisation au sein du thalle lichénique**

Par contre, trois genres (*Micrococcus* sp., *Agromyces* sp. et *Paraoerskovia* sp.) ont été isolés indépendamment du type de milieu de culture et sept genres (*Jannaschia* sp., *Agromyces* sp., *Micrococcus* sp., *Streptomyces* sp., *Sphingomicrobium* sp., *Microbacterium* sp. et *Erythrobacter* sp.) se sont révélés pouvant être aussi bien endolichénique qu'épilichénique pour *Lichina confinis* (**Figure 64A et B**).



**Figure 64 : A. Impact du milieu de culture et B. Impact de la localisation sur la diversité bactérienne cultivable (genres bactériens) associée à *Lichina confinis***

Du fait de la présence de quelques souches bactériennes connues pour être productrices de métabolites d'intérêts (*Streptomycetaceae*, *Nocardioïdaceae*, *Pseudonocardioïdaceae*, *Promicromonosporaceae* par exemple), il en résulte que les lichens sont également une source potentielle de souches bactériennes à forts potentiels biologiques.

## 2.4. Criblages génétiques et biologiques

Suite à l'étude de la diversité cultivable associée à ces quatre lichens, des criblages génétiques (gènes PKS I et PKS II) sur l'ensemble des *Actinobacteria* ont été réalisés par Dr. Sanjay Antony-Babu (Banyuls/Mer) et des criblages antibactériens (méthode des géloses molles) (par Elodie Desgranges, Cécile Villette à Banyuls/Mer pour les souches MOLA et par moi-même à Rennes pour les souches DP) sur l'ensemble des souches isolées et identifiées ont été effectués.

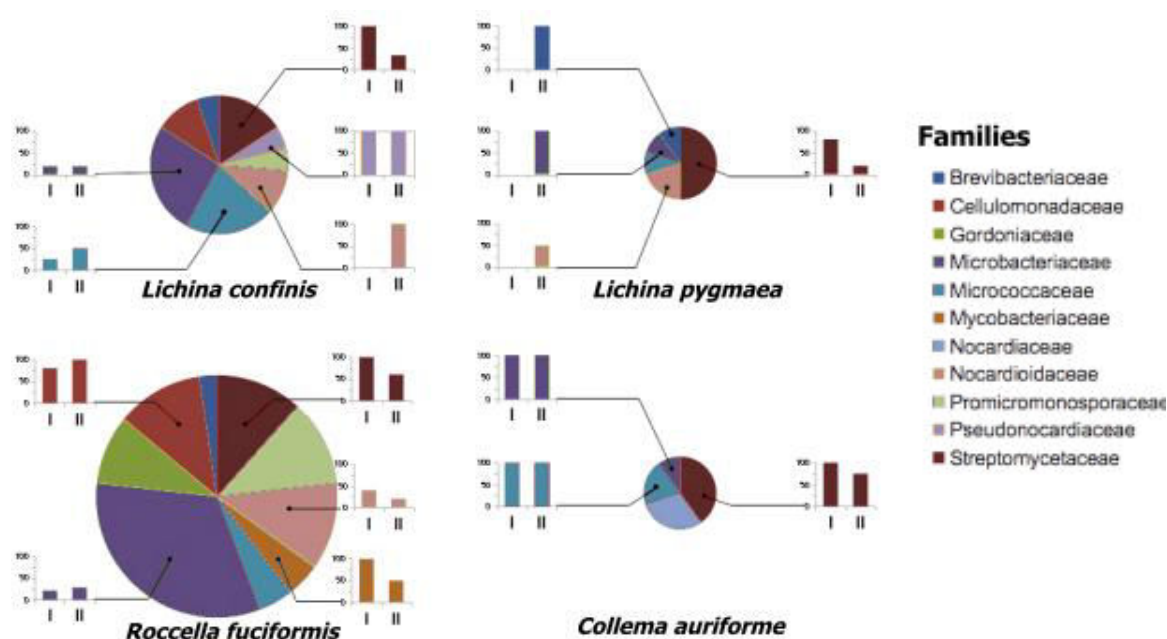
Les voies de biosynthèse des polyacétates (PKS) constituent l'une des principales voies pour la production de produits naturels très diversifiés (polyphénols, macrolides, polyènes, énediynes et aussi polyéthers). Chez les procaryotes, les PKS de type I itératives ou modulaires à III sont présents. Les PKS de type II sont trouvés principalement au sein des actinomycètes où certains sont connus pour produire des composés bioactifs.<sup>114</sup>

<sup>114</sup>Hertweck, C. (2009) *Angewandte Chemie International Edition* 48, 4688–716.



Ainsi, le potentiel biotechnologique des isolats a été examiné en utilisant une approche basée sur la PCR pour les gènes PKS de type I et II. Les PKS de type I ont été trouvés en proportion plus importante par rapport aux PKS de type II : 45,8% d'OTU positifs pour les PKS de type I par rapport aux 34,7% pour les PKS de type II. Cependant, le rapport a été fortement impacté par les souches appartenant à la famille de *Streptomycetaceae* dont 92,8% étaient positifs pour les PKS de type I et 35,0% également positifs pour les PKS de type II. Deux des trois autres familles d'intérêt, *Nocardioideaceae* et *Pseudonocardioaceae* représentaient au total 50% des PKS de type II et 30% des PKS de type I. Malheureusement, les souches *Promicromonosporaceae* n'ont montré aucune réponse positive pour les deux systèmes testés (**Figure 65**). En ce qui concerne les espèces lichéniques, les gènes PKS de type II ont majoritairement été mis en évidence au sein des *Actinobacteria* associées aux lichens du genre *Lichina*. Au sein de *R. fuciformis*, les *Actinobacteria* associées et isolées ont la possibilité d'exprimer majoritairement les gènes PKS de type I ou de manière équivalente (PKS de type I comme de type II) pour les *Actinobacteria* associées à *C. auriforme*.

Suite au criblage génétique, huit familles d'*Actinobacteria* (*Microbacteriaceae*, *Micrococcaceae*, *Streptomycetaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Cellulomonadaceae*, *Nocardioideaceae*, *Brevibacteriaceae* et *Pseudonocardioaceae*) se sont révélées être PKS I et/ou PKS II positives (**Figure 65**).



**Figure 65 : Proportion des OTUs de chaque famille d'*Actinobacteria* PKS I et/ou PKS II positifs**

(Analyses et représentations graphiques réalisées par Dr. Sanjay Anthony-Babu, Banyuls/Mer)

D'autre part, 12,6% des souches bactériennes cultivables présentent un potentiel de production de métabolites d'intérêts et en l'occurrence antibactériens non négligeable (**Tableau 22**). De manière générale, les souches bactériennes isolées ont montré plus fréquemment des propriétés

antibactériennes vis-à-vis des souches pathogènes du genre *Staphylococcus* (*S. aureus* et *S. epidermidis*). De plus, il est intéressant de noter la présence de neuf souches bactériennes cultivables montrant des potentiels antibactériens vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*. Ce point souligne l'intérêt de ces souches du fait de la présence de très peu, à l'heure actuelle, de molécules actives vis-à-vis de cette cible. Cependant, aucune souche n'a montré des propriétés antibactériennes vis-à-vis d'*E. coli* (**Tableau 22**).

**Tableau 22 : Ensemble des souches bactériennes cultivables positifs par le test en gélose molle : Propriétés antibactériennes (24 h d'incubation)**

Lichens	Codes souches	<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 4.38	<i>Staphylococcus epidermidis</i> CIP 68.21	<i>Staphylococcus epidermidis</i> CIP 81.55	<i>Escherichia coli</i> CIP 53126	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CIP 100.720
<i>Lichina confinis</i>	MOLA1509	+	+	+	-	-
	MOLA1512	-	+	+	-	-
	MOLA 1486	-	-	-	-	+
	MOLA 1488	+	+	+	-	+
	MOLA1493	-	+	-	-	-
	MOLA 1489	+	-	+	-	-
	MOLA 1437	-	-	-	-	+
<i>Lichina pygmaea</i>	MOLA1510	+	+	+	-	-
	MOLA1416	+	+	+	-	-
	MOLA 1415	+	+	+	-	-
	MOLA 1511	+	+	+	-	-
	MOLA 1427	+	+	+	-	-
<i>Rocella fuciformis</i>	MOLA 1617	+	+	+	-	+
<i>Collema auriforme</i>	DP88	-	+	-	-	-
	DP85	-	+	+	-	-
	DP83	+	+	+	-	-
	DP69	-	+	-	-	-
	DP15	-	+	-	-	-
	DP63	+	+	+	-	+
	DP54	-	+	-	-	-
	DP95	-	+	-	-	-
	DP1	+	+	+	-	-
	DP11	-	+	-	-	+
	DP81	-	+	-	-	-
	DP75	-	+	-	-	-
	DP49	-	+	-	-	-
	DP33	-	+	-	-	-
	DP52	-	+	-	-	-
	DP30	-	-	-	-	+
	DP93	-	-	-	-	+
	DP74	-	-	-	-	+

Suite à cela, deux d'entre elles (MOLA1488 et MOLA1416) ont été soumises à une étude chimique la plus complète possible : isolement, identification structurale et propriétés biologiques du fait de leur potentiel chimique et/ou de leur originalité (possible nouvelle espèce).

## 2.5. Etudes bactériochimiques

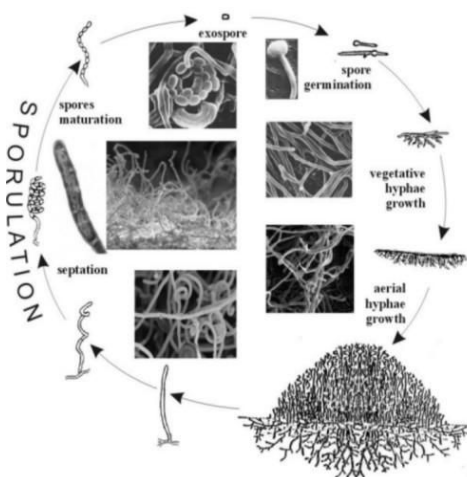
Après la mise en culture, la croissance bactérienne a été suivie par une mesure de DO à 450 nm et une fois la phase stationnaire atteinte (phase de production des métabolites spécifiques), la culture a été poursuivie pendant 7 jours. A l'issue de cette croissance, 5 g de résine XADHP7 (Sigma®) stériles ont été ajoutés à chaque milieu de culture afin de capter les métabolites produits dans le milieu.

Le lyophilisat constitué de la résine et du culot bactérien a été extrait premièrement par un mélange Acétone/MeOH (50/50, v/v) (trois fois successivement minimum) puis l'extrait obtenu a été évaporé à sec sous vide pour ensuite être contre-extrait par un mélange AcOEt/H<sub>2</sub>O (1/3, v/v) (trois fois successivement minimum). Après séchage et évaporation à sec sous vide de la phase organique, l'extrait AcOEt a été soumis à différentes méthodes de séparation.

### 2.5.1. Etude chimique de MOLA1488 : Streptomyces cyaneofuscatus

#### 2.5.1.1. Généralités des Streptomycetaceae : *Streptomyces* sp.

Le genre *Streptomyces* appartient au phylum des Actinobacteria et plus particulièrement à la famille des *Streptomycetaceae*. Depuis 2003, cette famille regroupe des espèces appartenant aussi bien au genre *Streptomyces*, au genre *Kitasatospora* qu'au genre *Streptacidiphilus*. La famille des *Streptomycetaceae* correspond à des bactéries de type aérobiques et de coloration Gram positif, présentant un métabolisme oxydatif et chemo-organotrophique et un mycélium aérien en forme de chaînette de trois à plusieurs spores. Les *Streptomyces* sont parmi les exemples les plus frappants de bactéries pluricellulaires et ont un cycle de vie complexe. Ils se développent en tant que substrat d'hyphes ramifiés qui tirent les éléments nutritifs à partir de l'environnement (sol, milieux de culture, etc...). Lorsque les nutriments sont épuisés, les colonies subissent une différenciation, aboutissant à une sporulation d'hyphes aériens. Ce processus de différenciation coïncide avec la production de métabolites spécifiques. Dans le substrat, les hyphes constitués de compartiments allongés séparés par des parois transversales occasionnelles contiennent plusieurs copies des chromosomes condensés, tandis que les branches aériennes à croissance rapide peuvent contenir jusqu'à 50 chromosomes murissant dans une chaîne d'exospores uni-nucléides, à paroi épaisse et arrondie<sup>115,116</sup> (Figure 66).



**Figure 66 : Cycle de développement du genre *Streptomyces***  
(Laboratory of Molecular Biology of Microorganisms (<http://www2.iitd.pan.wroc.pl>))

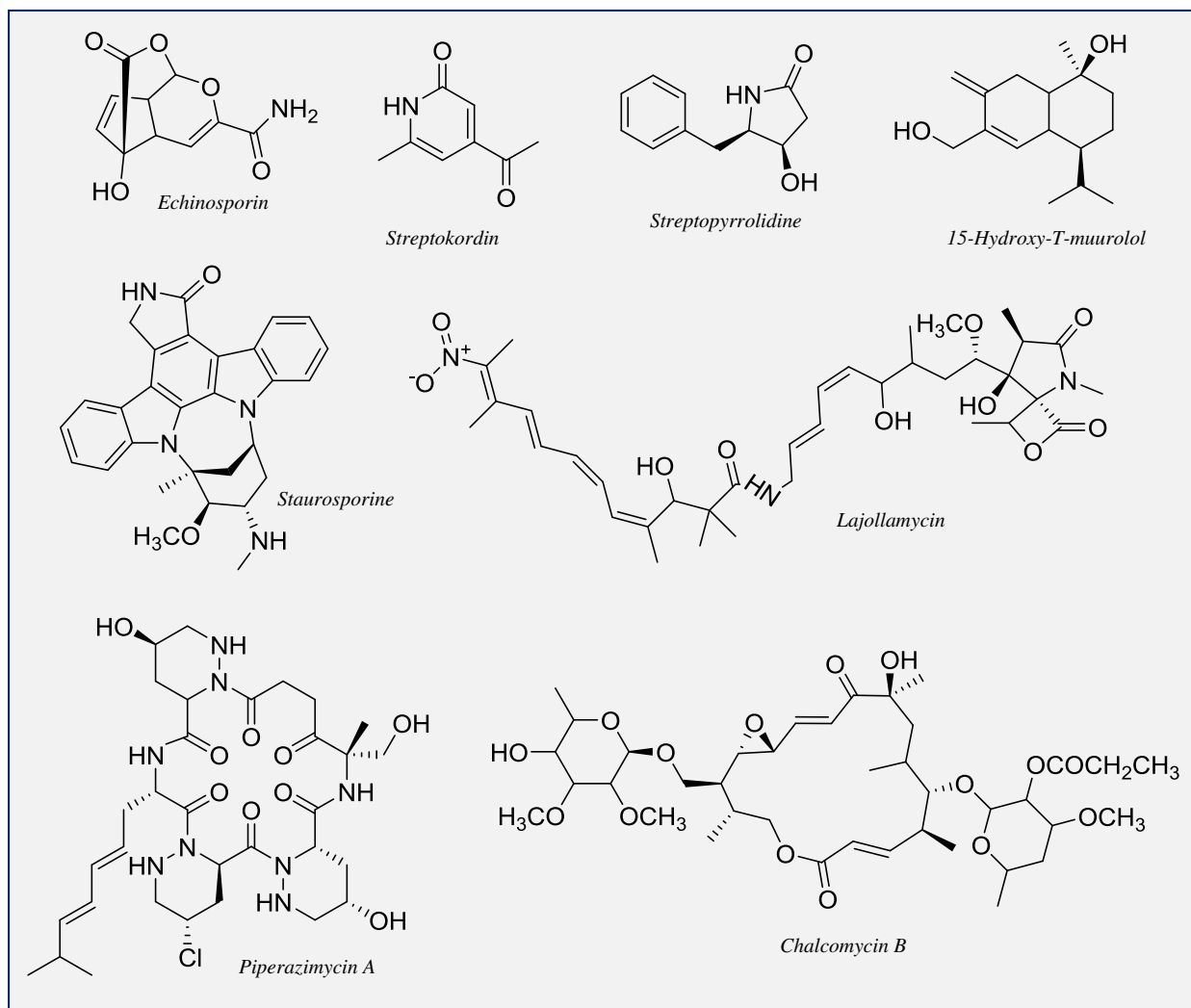
<sup>115</sup>Schrempf, H. (2006) Prokaryotes 3, 605.

<sup>116</sup>Kämpfer, P. (2006) Prokaryotes 3, 538.

Le sol constitue l'habitat le plus important des *Streptomyces* sp. En effet, il peut contenir entre  $10^4$  et  $10^7$  CFU (colony-forming units) de *Streptomyces* par gramme de sol représentant entre 1 et 20% même voire plus du total des micro-organismes du sol. Il est à noter que les environnements constitués de végétation à plantes grasses ou des sols riches en matières organiques représentent des lieux d'excellence pour le développement d'un très important nombre de *Streptomyces* sp. Ce genre est le plus important et représentatif des *Actinomycetes* d'habitats terrestres (90% minimum). Dans les habitats aquatiques, les espèces du genre *Micromonospora* dominent alors que celui des *Streptomyces* sp. est le second genre le plus abondant des micro-organismes cultivables.<sup>115</sup>

D'autre part, les *Streptomyces* sont à l'origine de la synthèse de nombreux métabolites bioactifs (antibactériens, antifongiques, cytostatiques, cytotoxiques, modulateurs de réponses immunes ou même encore inhibiteurs de nombreux processus cellulaires). En effet, sur les 23000 composés bioactifs produits par des micro-organismes, environ 10000 sont produits par des *Actinobacteria* (soit 45% de l'ensemble des métabolites synthétisés par les micro-organismes) et environ 7600 sont exclusivement produits par des bactéries du genre *Streptomyces*<sup>4</sup>. Différentes familles structurales peuvent être illustrées selon leurs voies de biogénèse : **polyacétates** (chalconomycine : inhibiteur de la synthèse de protéine dans les lignées cellulaires HeLa (cancer du col de l'utérus humain)), **acétyl-lactones** (echinosporine : inhibition de la prolifération cellulaire de différentes lignées cancéreuses), **polyacétates/NRPS** (non ribosomal peptide synthase) (lajollamycine : inhibiteur de la croissance des cellules de la lignée cellulaire B16 (mélanome murin)), **NRPS** (non ribosomal peptide synthase) (piperazimycine : propriétés antitumorales), **alcaloïdes** : indolocarbazoles (staurosporine, cytotoxique), **isoprénoides** (15-hydroxy-T-muurolol : cytotoxicité modérée sur 37 lignées tumorales humaines,  $CI_{50} = 6.7 \mu\text{g/mL}$ ), des **pyridines** : dérivés méthylpyridines (streptokordine : activités antitumorales vis-à-vis de 7 lignées cellulaires  $CI_{50}$  comprises entre 3.2 et 8.6  $\mu\text{g/mL}$ ), des dérivés **pyrroles** : tétrahydropyrroles (streptopyrrolidine, anti-angiogénèse sur les cellules endothéliales ombilicales humaines) par exemple (**Figure 67**).<sup>117</sup>

<sup>117</sup>Olano, C., Méndez, C., Salas, J. A. (2009) *Marine Drugs* 7, 210-248.



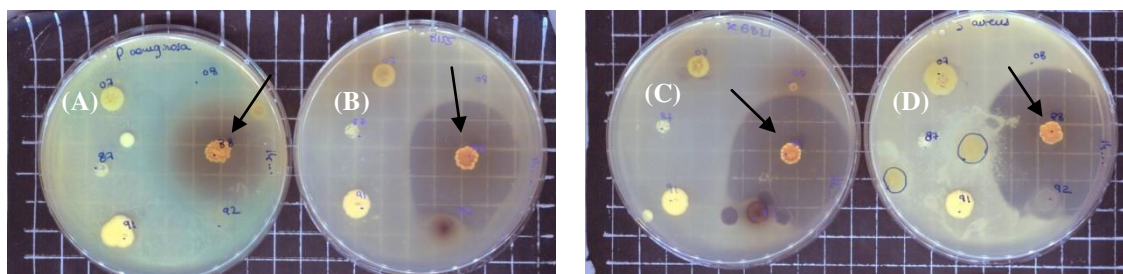
**Figure 67** : Illustrations de différents types structuraux produits par le genre *Streptomyces*

Par conséquent, le genre *Streptomyces* constitue une source importante pour la recherche de métabolites spécifiques bioactifs.

### 2.5.1.2. *Streptomyces cyaneofuscatus* (MOLA1488) : Etude chimique

#### 2.5.1.2.1. Propriétés biologiques

Cette souche bactérienne cultivable a été isolée de *Lichina confinis* et est similaire à 100% à *Streptomyces cyaneofuscatus*. De plus, elle possède probablement les gènes nécessaires pour la production de métabolites spécifiques d'intérêts (PKSI positive) et également des propriétés antibactériennes sur 4 des 5 cibles pathogènes testées (**Tableau 23** et **Figure 68**) (*Staphylococcus aureus*, deux souches de *S. epidermidis* et *Pseudomonas aeruginosa*).



**Figure 68** : Photographies des tests antimicrobiens effectués par la technique de la gélose molle sur MOLA1488 vis-à-vis de (A) *P. aeruginosa*, (B) *S. epidermidis* CIP8155, (C) *S. epidermidis* CIP 6821 et (D) *S. aureus*.

Après la mise en culture, l'extrait à l'AcOEt a été testé afin de déterminer la présence potentielle de métabolites bioactifs : propriétés cytotoxiques et antibactériennes. Ainsi, cet extrait a montré une  $CI_{50}$  de  $0.33 \pm 0.16$   $\mu\text{g/mL}$  sur les lignées cellulaires B-16 et de  $0.25 \pm 0.1$   $\mu\text{g/mL}$  sur les lignées cellulaires HaCaT (**Tableau 23**). Ce même extrait a également montré des propriétés antibactériennes sur *Staphylococcus epidermidis* CIP 81.55 et CIP 68.21 avec une CMI de 256  $\mu\text{g/mL}$  (**Tableau 24**).

**Tableau 23** :  $CI_{50}$  de l'extrait AcOEt de MOLA1488

Extraits	HaCaT		B-16	
	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Ecart type	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Ecart type
MOLA1488 AcOEt	0.25	0.1	0.33	0.16
Doxorubicine	$2.3 \cdot 10^{-2}$	$0.6 \cdot 10^{-3}$	$2.7 \cdot 10^{-2}$	$1.7 \cdot 10^{-2}$

**Tableau 24** : CMI (en  $\mu\text{g/mL}$ ) de l'extrait AcOEt de MOLA1488 sur 5 cibles bactériennes pathogènes

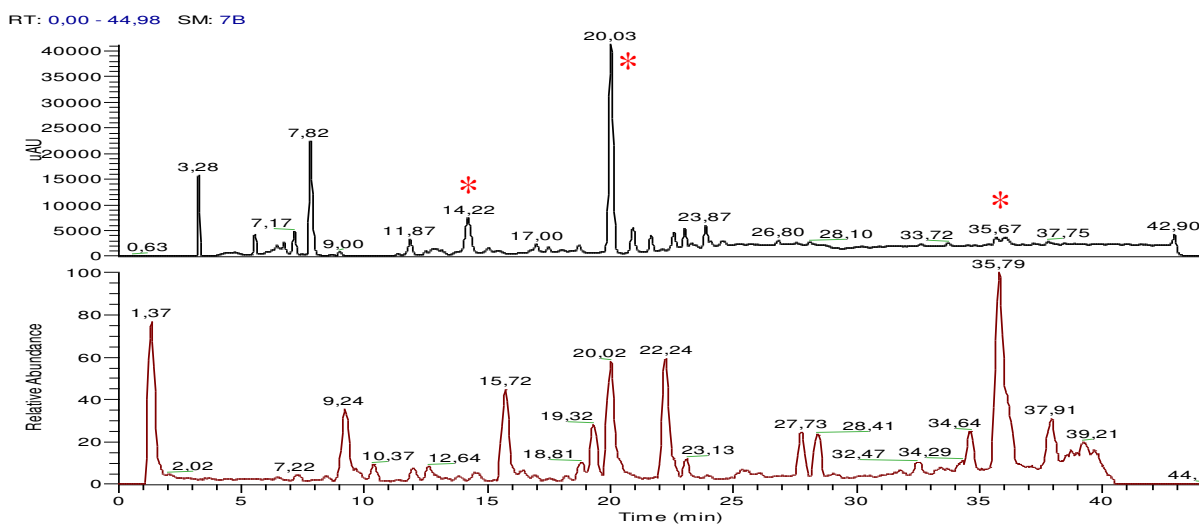
Extraits	<i>S. aureus</i> CIP 4.38	<i>S. epidermidis</i> CIP 81.55	<i>S. epidermidis</i> CIP 68.21	<i>E. coli</i> CIP 53126	<i>P. aeruginosa</i> CIP 100720
MOLA1488 AcOEt	> 256	256	256	> 256	> 256
Ofloxacin	600	15	15	7.5	75
Cefatoxime	75	30	22.5	150	375
Chloramphénicol	600	300	225	> 1500	> 600

Ainsi, ces deux tests biologiques préliminaires sur l'extrait total à l'AcOEt de MOLA1488 met en évidence la présence de molécules intéressantes, antibactériennes et/ou cytotoxiques mais avec un plus fort potentiel cytotoxique. Cependant, les propriétés antibactériennes de l'extrait AcOEt de MOLA1488 qui ont été mis en évidence sont moindres par rapport au potentiel de la souche elle-même (**Figure 68**). En effet, l'activité antibactérienne de l'extrait n'a été trouvée uniquement sur les deux cibles de *Staphylococcus epidermidis*. Cela peut être expliqué soit par un effet concentration, soit par la non production ou la non extraction des métabolites antibactériens dans les conditions utilisées, soit par une synergie nécessaire entre plusieurs métabolites non présents en totalité dans l'extrait ou soit par la possibilité de production de molécules de réponses (molécules signal) vis-à-vis des cibles testées par la méthode en gélose molle. En effet, dans cette méthode, les souches bactériennes testées

sont toujours en croissance sur le milieu de culture et peuvent modifier leur production chimique lors de l'ajout de la gélose molle contenant la cible pathogène.

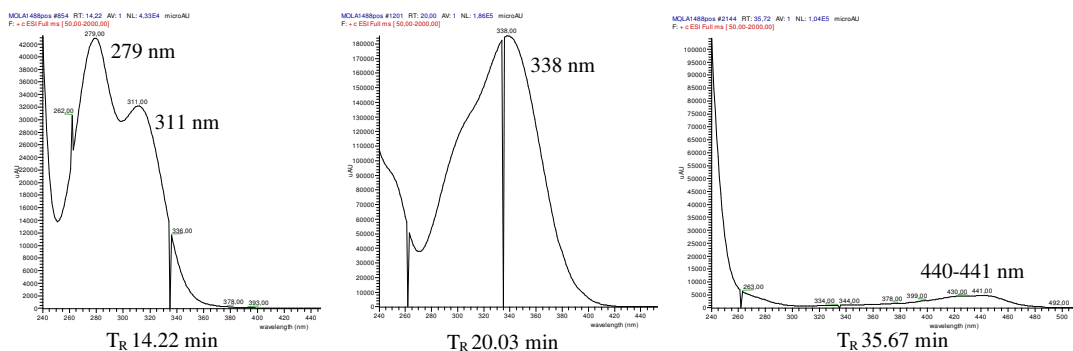
### 2.5.1.2.2. Analyses LC-ESI-MS/MS

Afin d'obtenir une première idée de la composition chimique de cet extrait, une analyse par LC-ESI-MS/MS a été réalisée. Ceci a permis de mettre en évidence la présence de nombreux composés aussi bien au niveau des chromatogrammes UV que des chromatogrammes de masse (rapport de  $m/z$  allant de 50 à 2000 uma) (**Figure 69**).



**Figure 69 : Chromatogrammes UV (A) et de masse en mode positif (B) de l'extrait AcOEt de MOLA1488**

De plus, les données spectrales (UV) de certains de ces métabolites (\*) sont particulières (**Figure 70**). En effet, certains d'entre eux présentent des maxima d'absorbance dans les longueurs d'onde proche du visible ( $300 < \lambda < 400$  nm) ou dans le visible ( $\lambda \geq 400$  nm) indiquant la présence de groupements particuliers (noyau de type quinone, anthraquinone, phénazine, phénoxazine, etc...) suggérant une diversité structurale intéressante (**Figure 70**).

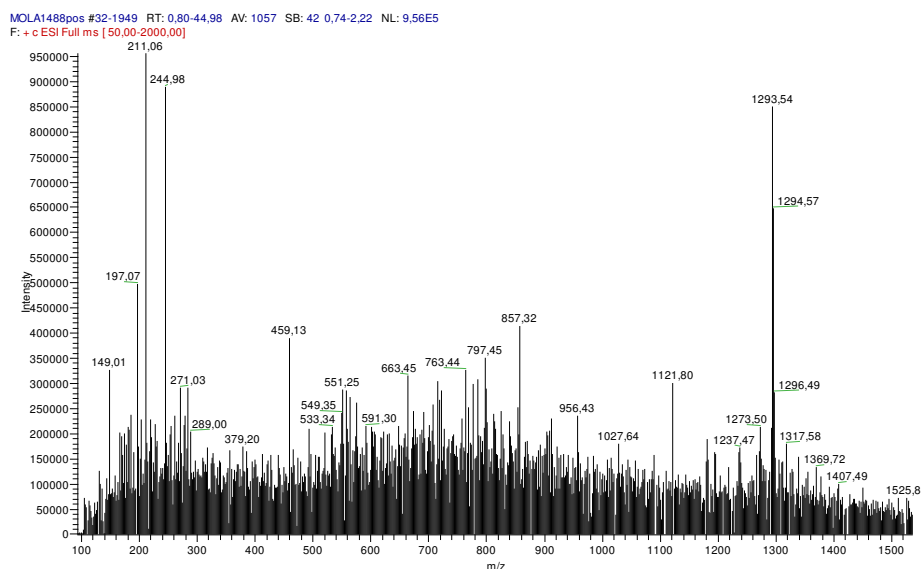


**Figure 70 : Spectres UV de trois métabolites (\*) présents dans l'extrait AcOEt de MOLA1488**

A partir du spectre de masse enregistré, il en résulte également une large gamme de métabolites allant des faibles poids moléculaires ( $[M+H]^+$   $m/z$  149 uma) au relativement haut poids



moléculaires ( $[M+H]^+$   $m/z$  1293 uma). La plupart des métabolites présents sont localisés dans une gamme de masse relativement large comprise entre  $[M+H]^+$   $m/z$  100 et 900 uma (**Figure 71**).



**Figure 71** : Spectre de masse ( $[M+H]^+$   $m/z$ ) de l'extrait AcOEt de MOLA1488

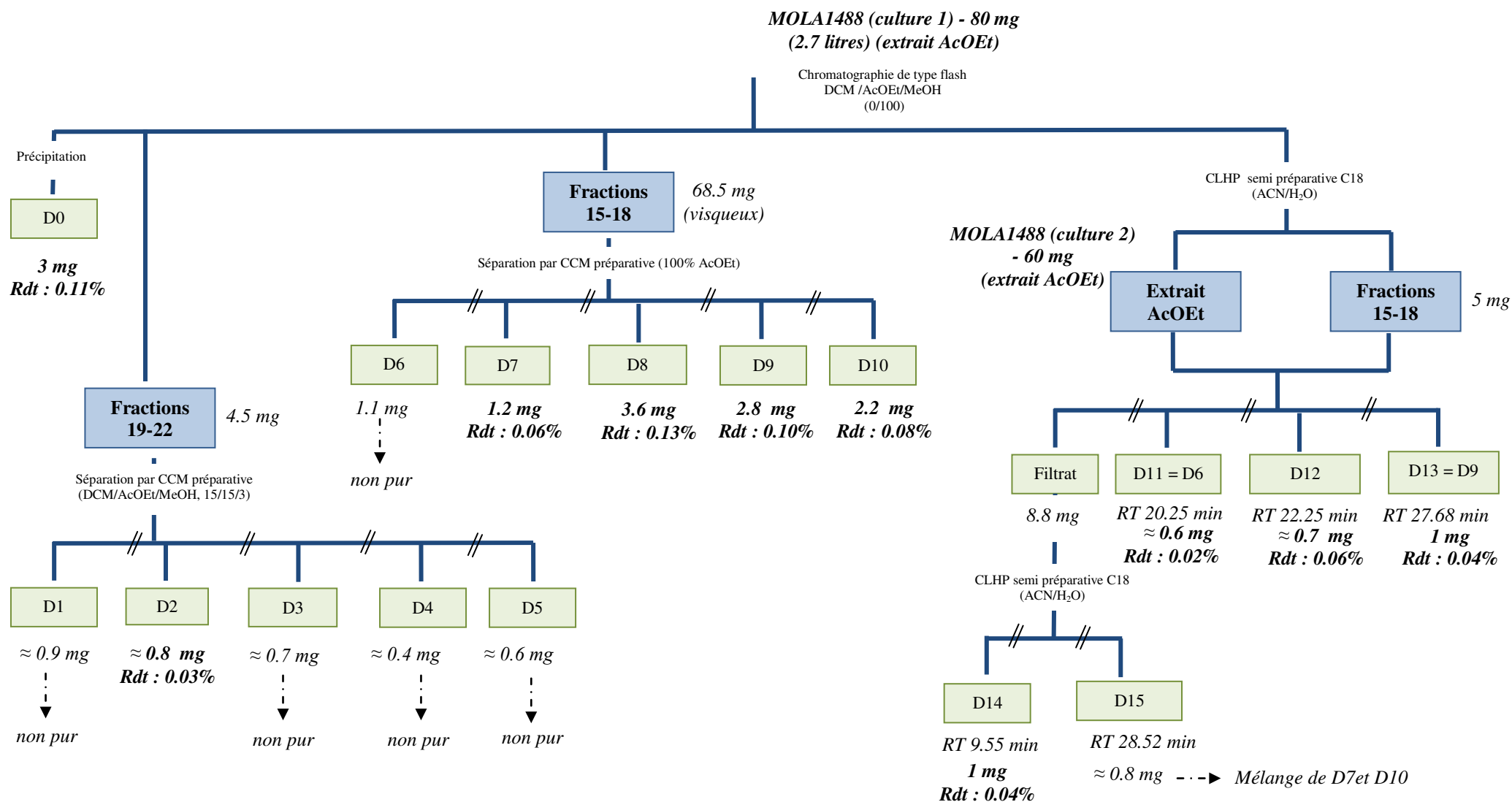
Ainsi, cette souche bactérienne contient un grand nombre de métabolites bioactifs pouvant être différent d'un point de vue structural (poids moléculaires comme groupements particuliers).

#### 2.5.1.2.3. Isolement et identification des métabolites

Afin de caractériser les métabolites spécifiques produits par cette souche (actifs comme inactifs) les extraits à l'AcOEt obtenus après deux cultures liquides de cette souche ont été séparés par diverses techniques séparatives. L'extrait ( $\approx 80$  mg visqueux) obtenu lors d'une première culture a permis d'isoler premièrement un composé (**D0**) par la formation d'un précipité à froid. Le composé a été obtenu après filtration. Le reste de l'extrait AcOEt a été soumis à une chromatographie de type flash sur gel de silice ( $\text{SiO}_2$ , 25 g, Biotage). Un dépôt solide d'environ 70 mg a été effectué. La phase mobile choisie est constituée d'un mélange binaire DCM/AcOEt puis AcOEt/MeOH comme décrit dans la partie Matériels & Méthodes ce qui a abouti à l'obtention de 150 fractions de 10 mL. Après regroupement des fractions similaires entre elles, les fractions 15-18 (68.5 mg visqueux) et 19-22 (4.5 mg) ont été soumises respectivement à des CCM préparatives sur silice (DCM/AcOEt/MeOH, 15/15/3, v/v/v ou AcOEt 100%). Les dépôts ont été réalisés à l'aide d'un déposeur automatique CAMAG® afin d'obtenir une séparation après migration la plus résolue possible. Ainsi, à partir de la fraction 19-22, cinq autres composés ont été isolés (**D1** à **D5**). La fraction 15-18 a permis d'obtenir cinq composés (**D6** à **D10**). A partir également de la fraction 15-18, une séparation par CLHP ( $\text{C}_{18}$  ;  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ ) a été réalisée. Cette séparation a permis d'isoler trois composés supplémentaires (**D11** à **D13**). Le filtrat de cette analyse CLHP a été à son tour soumis à une séparation semi préparative sur CLHP ( $\text{C}_{18}$  ;  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$  ; 90/10, v/v) est a permis d'isoler à nouveau deux autres composés (**D14** et **D15**). Les



produits isolés ont été analysés par RMN, LC/MS et HRESIMS et leurs propriétés biologiques (dépendantes des quantités isolées) ont été évaluées (propriétés cytotoxiques en particulier). L'ensemble des fractionnements et purifications est résumé **Figure 72**.

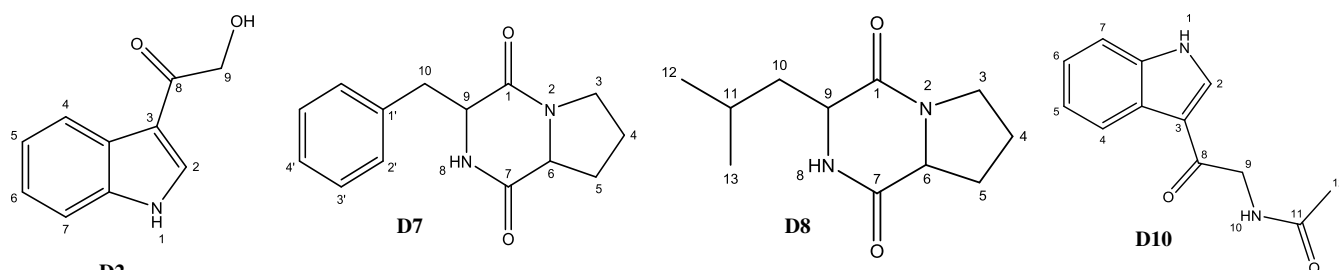


**Figure 72** : Schéma de séparation et d'isolement des composés issus des deux cultures de MOLA1488 en milieu liquide Luria Broth (LB)  
(Rendement exprimé en fonction des 2.7 L de culture réalisés)

Suite à cette première culture, seize composés (**D0** à **D15**) ont été isolés à partir de l'extrait AcOEt par différentes techniques chromatographiques. Parmi ces seize composés, seulement dix ont pu être identifiés structurellement. Les six autres composés n'ont pas pu l'être, cela lié à une quantité trop faible et/ou à une pureté non satisfaisante.

Par conséquent, les composés **D0**, **D2**, **D7**, **D8**, **D9** (= **D13**), **D10**, **D11** (= **D6**), **D12** et **D14** ont été isolés en quantité et pureté satisfaisante pour être identifiés structurellement à partir de données spectrales de type RMN ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY, TOCSY, HMBC et HSQC), HRMS, LC/MS et en comparaison par rapport à la base de donnée Antibase 2012 et la littérature.

Parmi ces huit composés isolés lors de cette première culture, quatre d'entre eux (**D2**,  $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$  : 0.8 mg, **D7**,  $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_2$  : 1.2 mg, **D8**,  $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$  : 3.6 mg et **D10**,  $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{NO}_2$  : 2.2 mg) ont déjà été isolés à partir de diverses sources : bactériennes, fongiques, éponges... Il s'agit de deux dicétopipérazines (**D8** : cyclo-(L-Leu,L-Pro)<sup>118,119</sup> et **D7** : cyclo-(L-Phe,L-Pro))<sup>119,120</sup>, d'un indole (**D2** : 3-(hydroxyacétyl) indole)<sup>118,121,122</sup> et d'un dérivé de la tryptamine (**D10** : *N*-acétyl-beta-oxotryptamine)<sup>118</sup> (**Figure 73**). De nombreuses activités (cytotoxiques, antibactériennes, antifouling, antifongiques ...) ont été décrites pour divers dicétopipérazines isolées principalement à partir d'organismes marins ou de communautés bactériennes associées à des organismes marins.<sup>123–125</sup>



**Figure 73** : Structures de composés **D2**, **D7**, **D8** et **D10** isolés de MOLA1488

Les données RMN ( $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ ) obtenues pour ces quatre composés sont décrites dans le **Tableau 25** ci-dessous :

<sup>118</sup>Martínez-Luis, S., Gómez, J. F., Spadafora, C., Guzmán, H. M., and Gutiérrez, M. (2012) *Molecules* 17, 11146–55.

<sup>119</sup>Rui, H., Bochu, W., Wakimoto, T., Manyuan, W., Liancai, Z., and Ikuro, A. (2013) *Journal of the Brazilian Chemical Society* 24, 1926–1932.

<sup>120</sup>Begum, A. S., Basha, S. A., Raghavendra, G., Venkata, M., Kumar, N., Singh, Y., Patil, J. V., Tanemura, Y., Fujimoto, Y. (2014) *Chemistry & Biodiversity* 11, 92–100.

<sup>121</sup>Bernart, M., and Gerwick, W. H. (1990) *Phytochemical Analysis* 29, 3697–3698.

<sup>122</sup>Yang, S.-W., and Cordell, G. A. (1997) *Journal of Natural Products* 60, 44–48.

<sup>123</sup>Borthwick, A. D. (2012) *Chemical Reviews* 112, 3641–3716.

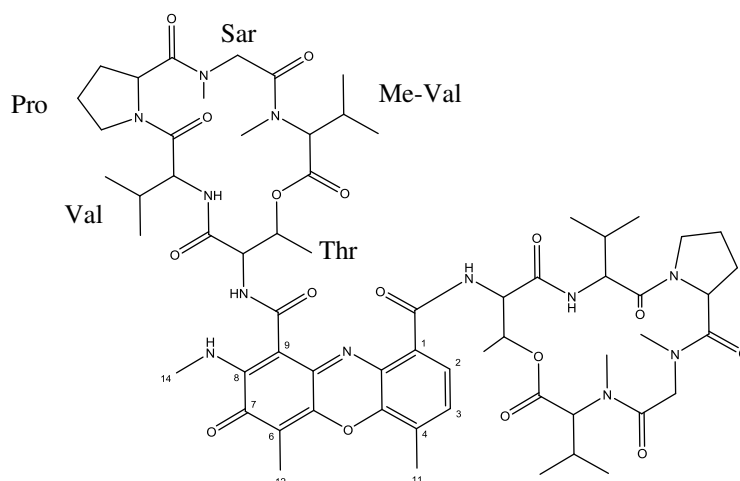
<sup>124</sup>Zhou, X., Xu, T., Yang, X., Liu, Y., and Utilization, S. (2010) *Chemistry & Biodiversity* 7, 2809–2829.

<sup>125</sup>Carvalho, M. P., and Abraham, W. R. (2012) *Current Medicinal Chemistry* 19, 3564–3577.

**Tableau 25 : Données spectrales RMN (ppm) des composés D2, D7, D8 et D10 dans le CDCl<sub>3</sub> à 500 MHz**

Composé D2 <sup>117</sup>			Composé D7 <sup>118</sup>			Composé D8 <sup>118</sup>			Composé D10 <sup>120</sup>		
Position	$\delta_C$	$\delta_H$ (J en Hz) (allure)	Position	$\delta_C$	$\delta_H$ (J en Hz) (allure)	Position	$\delta_C$	$\delta_H$ (J en Hz) (allure)	Position	$\delta_C$	$\delta_H$ (J en Hz) (allure)
<b>1-NH</b>	-	8.87 (sl)	<b>1</b>	168.4	-	<b>1</b>	166.36	-	<b>1-NH</b>	-	8.78 (sl)
<b>2-CH</b>	130.58	7.93 (3.00) (d)	<b>2</b>	-	-	<b>2</b>	-	-	<b>2-CH</b>	131.13	7.88 (5) (d)
<b>3</b>	114.26	-	<b>3-CH<sub>2</sub></b>	45.45	3.50-3.63 (m)	<b>3-CH<sub>2</sub></b>	45.75	3.39-3.60 (m)	<b>3</b>	123.17	-
<b>3a</b>	126.40	-	<b>4-CH<sub>2</sub></b>	22.55	1.83-1.92 (m)	<b>4-CH<sub>2</sub></b>	22.98	1.66-1.71 (m)	<b>3a</b>	127.67	-
<b>4-CH</b>	121.94	8.32-8.34 (m)	<b>5-CH<sub>2</sub></b>	28.34	1.94-2.01 (m)	<b>5-CH<sub>2</sub></b>	28.35	2.28-2.32 (m)	<b>4-CH</b>	122.10	8.26-8.28 (m)
<b>5-CH</b>	124.11	7.44-7.46 (m)	<b>6-CH</b>	59.12	4.07 (12.8 ; 8.1 ; 6.0) (tt)	<b>6-CH</b>	59.22	4.07 (10-15) (dd)	<b>5-CH</b>	129.18	7.31-7.33 (m)
<b>6-CH</b>	123.12	7.32-7.35 (m)	<b>7</b>	168.4	-	<b>7</b>	170.32	-	<b>6-CH</b>	127.67	7.28-7.30 (m)
<b>7-CH</b>	111.65	7.45 (3.0 ; 7.9) (dd)	<b>8-NH</b>	-	5.55 (s)	<b>8-NH</b>	-	5.80 (s)	<b>7-CH</b>	129.68	7.40-7.42 (m)
<b>7a</b>	136.11	-	<b>9-CH</b>	56.14	4.22 (0.9 ; 3.7 ; 10.8) (ddd)	<b>9-CH</b>	53.58	3.97 (10-5) (dd)	<b>7a</b>	136.19	-
<b>8</b>	193.19	-	<b>10-CH<sub>2</sub></b>	36.75	3.48-3.63 (m)	<b>10-CH<sub>2</sub></b>	38.83	1.86-2.06 (m)	<b>8</b>	199.07	-
<b>9-CH<sub>2</sub></b>	65.34	4.78 (s)	<b>1'</b>	113	-	<b>11-CH</b>	24.95	1.44-1.52 (m)	<b>9-CH<sub>2</sub></b>	46.55	4.73 (sl)
<b>10-OH</b>	-	3.36	<b>2'/6'-CH</b>	129.3	7.29-7.32 (m)	<b>12-CH<sub>3</sub></b>	23.56	0.95 (10) (d)	<b>10-NH</b>	-	8.83 (s)
			<b>3'/5'-CH</b>	129.07	7.23-7.26 (m)	<b>13-CH<sub>3</sub></b>	21.38	0.90 (10) (d)	<b>11</b>	170.08	-
			<b>4'-CH</b>	127.58	7.16-7.19 (m)				<b>12-CH<sub>3</sub></b>	23.20	2.11 (s)

De plus, un dérivé de la dactinomycine (**D9 = D13**) (1 mg) a également été isolé à partir de cette souche bactérienne. Par comparaison des données HRESIMS ( $C_{64}H_{88}O_{16}N_{17}$ ) et RMN obtenues sur ce composé et par rapport aux données disponibles à partir d'un brevet (CN 102617707 A, 2012)<sup>126</sup>, on a pu confirmer l'identification structurale du composé **D9** comme étant la *N*-Me-dactinomycine. Les spectres RMN-<sup>1</sup>H et jmod montrent la présence de signaux caractéristiques d'acides aminés (**Figure 74, Tableau 26**). Les actinomycines de manière générale présentent des propriétés cytotoxiques (vis-à-vis du cancer du colon avec 98% d'inhibition à 30 µg/mL par exemple)<sup>127,128</sup>, antibactériens (bactéries de coloration gram positif comme négatif comme par exemple vis-à-vis de *Mycobacterium tuberculosis* : CMI 0.78 µg/mL)<sup>127,128</sup>. De plus, un médicament dont le principe actif est l'actinomycine D est commercialisé sous le nom de Cosmegen et est utilisé en cancérologie.



**Figure 74 : Structure de la *N*-Me-Dactinomycine (D9, D13)**

<sup>126</sup>Jihong, J., Bo, Y., Yongqiang, C., Youjian, F., Fengmei, C., Xiuyun, J., Li, W., Xiaoying, C., Sheng, Q., Jinjuan, L., and Guangkai, B. Brevet CN 102617707 A (2012) p 14.

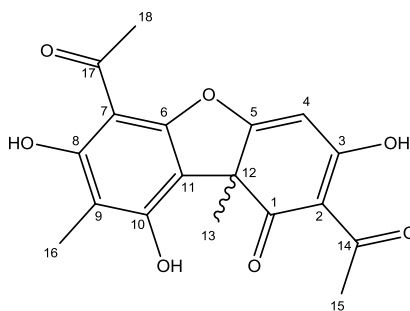
<sup>127</sup>Praveen, V., and Tripathi, C. K. M. (2009) *Letters and Applied Microbiology* 49, 450–5.

<sup>128</sup>Hollstein, U. (1973) *Chemical Reviews* 74, 625–652.

**Tableau 26** : Données spectrales RMN (ppm) de la *N*-Me-dactinomycine (CDCl<sub>3</sub>) à 500 MHz et 125 MHz

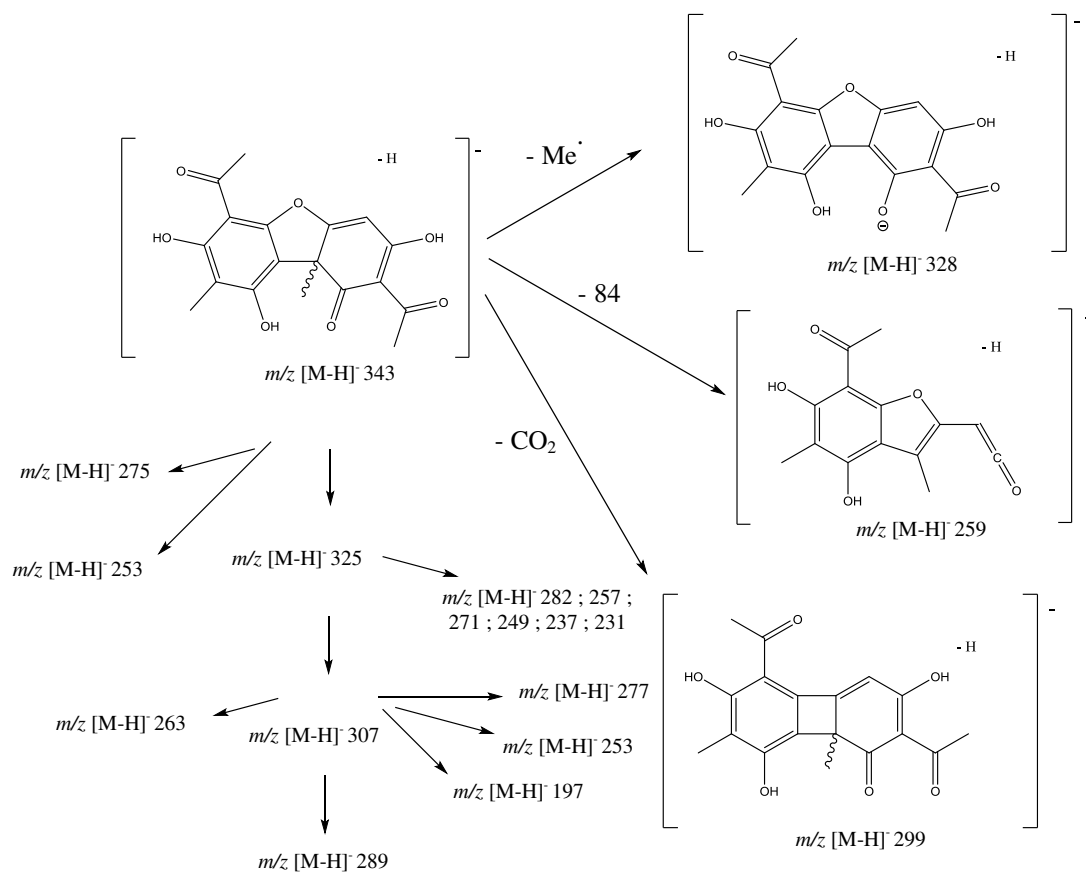
Classe des carbones	$\delta_C$	$\delta_H$	Attribution	Classe des carbones	$\delta_C$	$\delta_H$	Attribution
Carbonyle	208.92	-	C <sub>7</sub> (CO)	Aliphatique	74.75	5.69	Thr CH
	179.14	-	Me-Val CO		74.69	5.69	Thr CH
	174.07	-	Val CO		71.50	5.03	Thr CH
	173.62	-	Val CO		71.34	5.03	Thr CH
	173.17	-	Me-Val CO		59.00	4.23	Me-Val CH
	172.73	-	Thr CO		57.19	4.23	Me-Val CH
	170.05	-	Thr CO		56.33	4.34	Val CH (x2)
	168.92	-			55.01	4.40	Pro CH
	167.54	-	Pro CO (x2)		54.80	4.40	Pro CH
Hétéro-aromatique	166.30	-	Sar CO (x2)		52.88	4.09	Sar CH <sub>2</sub>
					51.37	4.09	Sar CH <sub>2</sub>
	147.41	-	C <sub>8</sub>		47.47	3.51-3.41	Pro CH <sub>2</sub> (x2)
	145.87	-	C <sub>9a</sub>		39.45	2.96	Sar-NCH <sub>3</sub>
	145.05	-	C <sub>5a</sub>		39.28	2.96	Sar-NCH <sub>3</sub>
	140.52	-	C <sub>4a</sub>		34.91	3.27	Me-Val-NCH <sub>3</sub>
	132.20	- / 7.12	C <sub>1a</sub> / C <sub>3</sub>		34.77	3.27	Me-Val-NCH <sub>3</sub>
	130.30	7.50	C <sub>2</sub>		31.94	2.73	Val CH
	129.42	-	C <sub>1</sub>		31.75	2.73	Val CH
	127.51	-	C <sub>4</sub>		31.05	2.34-2.09	Pro CH <sub>2</sub> (x2)
	113.58	-	C <sub>6</sub>		29.14	3.06	Me-Val CH
	101.82	-	C <sub>9</sub>		26.91	3.06	Me-Val CH
	54.80	2.81	NH-CH <sub>3</sub>		24.74	2.02-1.92	Pro CH <sub>2</sub>
					22.71	2.02-1.92	Pro CH <sub>2</sub>
					21.76	1.35	Thr CH <sub>3</sub>
					21.66	1.35	Thr CH <sub>3</sub>
					19.29	0.71	Me-Val CH <sub>3</sub>
					19.13	0.71	Me-Val CH <sub>3</sub>
					18.96	0.86	Me-Val CH <sub>3</sub>
					18.87	0.86	Me-Val CH <sub>3</sub>
					17.79	0.96	Val CH <sub>3</sub> (x2)
					17.26	0.96	Val CH <sub>3</sub> (x2)
					15.10	2.15	C <sub>4</sub> CH <sub>3</sub>
					7.82	2.34	C <sub>6</sub> CH <sub>3</sub>

Le composé **D14** (1 mg) a été lui aussi isolé à partir de cette culture bactérienne. Par comparaison aux données de HRESIMS (C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>7</sub>), MS/MS et RMN obtenues sur ce composé et par rapport aux données disponibles, on a pu confirmer l'identification structurale du composé **D14** comme étant l'acide usnique (**Figures 75, 76** et **Tableau 27**). L'acide usnique est un métabolite qui est présent de manière importante chez les lichens (e.g. *Usnea* sp., *Ramalina* sp., etc.) et possède des propriétés biologiques multiples : antifongiques, antiprolifératives, antibactériennes, etc.<sup>20</sup>

**Figure 75** : Structure de l'acide usnique (**D14**)

**Tableau 27** : Données spectrales RMN (ppm) de l'acide usnique (D14) à 500 MHz et 125 MHz

Position	$\delta_c$	$\delta_H$ (J en Hz) (allure)
1	198.5	-
2	103.9	-
3	?	-
4	101.5	5.98 (s)
5	179.4	-
6	?	-
7	101.5	-
8	163.9	-
9	108.7	-
10	157.9	-
11	?	-
12	58.3	-
13	35.0	1.73 (s)
14	201.6	-
15	31.3	2.63 (sl)
16	104.4	2.10 (s)
17	200.5	-
18	34.5	2.66 (sl)
3-OH	-	11.05 (s)
8-OH	-	13.32 (s)
10-OH	-	11.05 (s)

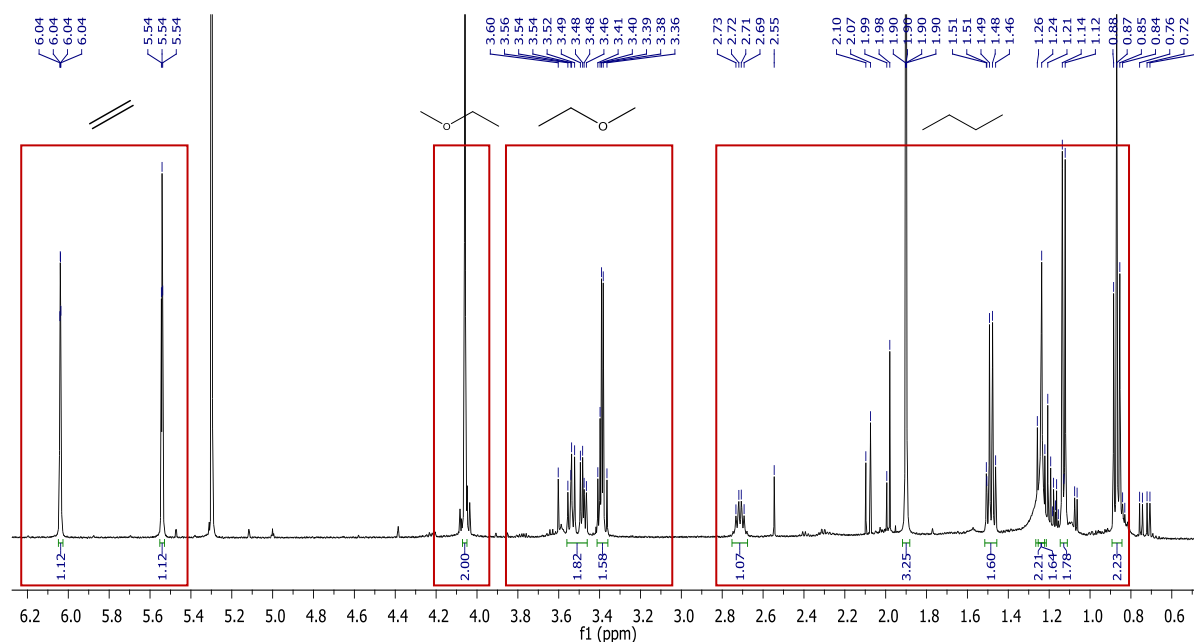


**Figure 76** : Schéma de fragmentation de l'acide usnique (D14)

Outre ces cinq composés isolés et identifiés à l'issue de cette culture, un autre métabolite est en cours d'identification structurale (**D0** :  $C_{50}H_{96}O_6$ ). Suite aux premières investigations, le composé **D0** semble être un dérivé de type triacylglycérol.

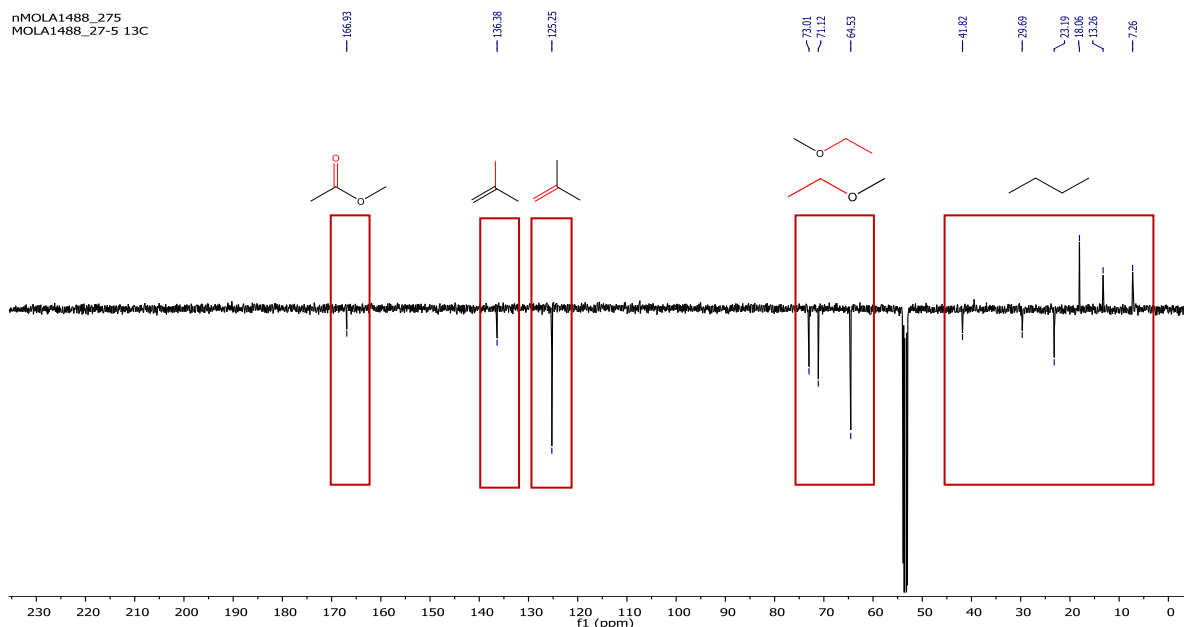
Ainsi, différents métabolites ont été isolés suite à cette première culture mais par manque de quantité ou d'une pureté insuffisante, certains métabolites n'ont pas pu être isolés et identifiés. Pour parer à cela, une nouvelle culture a été réalisée de la même manière que précédemment. A partir de l'extrait à l'AcOEt, une séparation semi préparative par CLHP (C18) a été réalisée ( $H_2O/ACN$ ) et deux composés ont pu être isolés en quantité suffisante pour permettre la réalisation des analyses structurales par RMN et HRESIMS : **D11** (= **D6** :  $C_{64}H_{86}N_{12}O_{17}$ ,  $\lambda_{max}$  441 nm) (0.9 mg) et **D12** (1 mg).

D'après les données HRESIMS, le composé **D12** a une formule brute suivante :  $C_{18}H_{28}O_7$ , ce qui correspond à un  $m/z$   $[M+Na]^+$  379.1727. Le composé n'a jamais été décrit dans la littérature. Les analyses RMN- $^1H$ , DEPT et 2D (COSY, TOCSY, HSQC et HMBC) (500 et 125 MHz) ont été réalisées dans le  $CD_2Cl_2$ . Les spectres RMN- $^1H$  et DEPT du composé **D12** révèlent la présence des fonctions suivantes : deux carbones cétoniques ( $\delta_C$  166.93), deux carbones méthyléniques ( $\delta_C$  136.38 ;  $\delta_C$  125.25 et  $\delta_H$  5.54 et 6.04) suggérant la présence de deux groupements  $C=CH_2$ , quatre fonctions  $OCH_2$  ( $\delta_C$  72.98 et 71.11 ;  $\delta_H$  3.46-3.60 et 3.40 ;  $\delta_C$  64.48 ;  $\delta_H$  4.06), trois  $CH_3$  ( $\delta_C$  18.02, 13.26 et 7.26 ;  $\delta_H$  1.90, 1.13 et 0.87) ainsi que la présence de groupements dans la zone des aliphatiques :  $CH$  ( $\delta_C$  39.41 ;  $\delta_H$  2.71) et un  $CH_2$  aliphatique ( $\delta_C$  23.14 ;  $\delta_H$  1.49) (**Figure 77** et **78**).



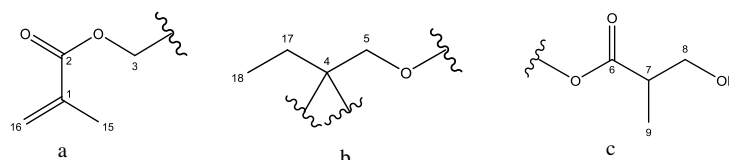
**Figure 77** : Spectre  $^1H$ -RMN ( $CD_2Cl_2$ ) du composé **D12** isolé de MOLA1488 à 500 MHz





**Figure 78 :** Spectre jmod (CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) du composé **D12** isolé de MOLA1488 à 125 MHz

Ces données spectrales ont permis d'identifier la structure du composé **D12**. Ce dernier est constitué principalement de 3 fragments (a, b et c) dont les déterminations structurales sont détaillées par la suite (**Figure 79**).



**Figure 79 :** Structure des fragments (a, b et c) du composé **D12**

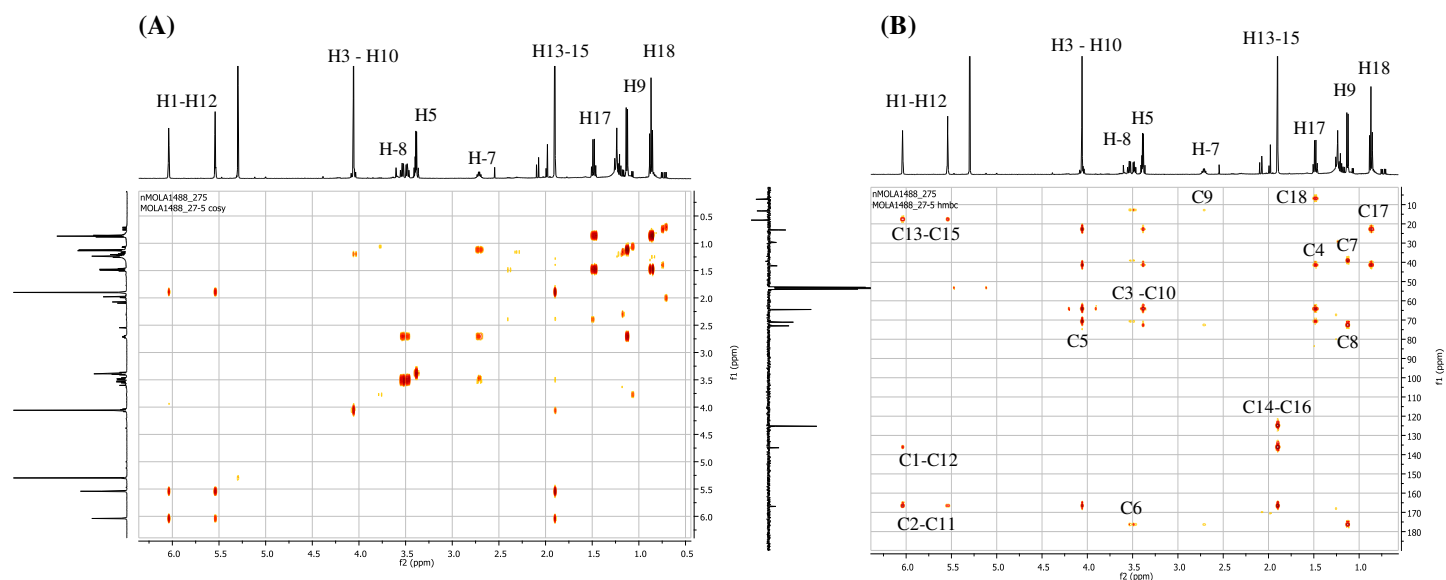
Le fragment **a** est constitué d'un CH<sub>3</sub> à  $\delta_H$  1.90 (H-15,  $\delta_C$  18.02), d'un méthylène à  $\delta_H$  5.54 et 6.04 (H-16,  $\delta_C$  125.25) et d'un groupement carbonyle d'une fonction ester  $\delta_C$  166.93. Les corrélations observées en RMN 2D <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY montrent que le méthylène est lié au CH<sub>3</sub>. Ces deux derniers groupements sont séparés par l'intermédiaire probablement de deux carbones quaternaires (C1 et C2) et de l'oxygène. Ceci est également confirmé par l'analyse du spectre RMN <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC montrant les corrélations entre les protons H15 et H16 ( $\delta_H$  1.90 ;  $\delta_H$  5.54 et 6.04) avec le carbone quaternaire C1 ( $\delta_C$  136.38) et entre le H16 et H3 et le carbone quaternaire C2 ( $\delta_C$  166.93).

Le fragment **b** contient une petite chaîne aliphatique (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> ;  $\delta_C$  (CH<sub>2</sub>) 23.14,  $\delta_C$  (CH<sub>3</sub>) 7.26 ;  $\delta_H$  (CH<sub>2</sub>) 1.46-1.51,  $\delta_H$  (CH<sub>3</sub>) 0.87) ainsi qu'un groupement CH<sub>2</sub>-O. Les spectres 2D <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY et <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC mettent en évidence les corrélations entre le H18 avec le H17 ainsi qu'entre le H5 et le C17 via le carbone quaternaire C4 ( $\delta_C$  41.36) qui est lui-même corrélé aux protons du CH<sub>2</sub> aliphatique (H17).

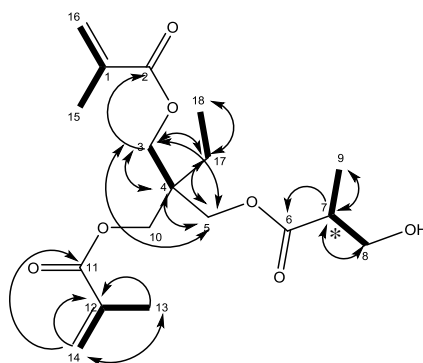
Enfin, le fragment **c** est constitué d'un CH<sub>3</sub> (C9,  $\delta_H$  1.13 ;  $\delta_C$  13.26) corrélant avec un CH (C7,  $\delta_H$  2.69-2.73 ;  $\delta_C$  39.41) lui-même lié au CH<sub>2</sub>OH (C8,  $\delta_C$  72.98) au vu des corrélations <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY.

Les données de 2D RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC confirment la présence d'un groupe carbonyle au sein de ce fragment (C6,  $\delta_{\text{C}}$ 176.10) corrélant aux protons H7, H8 et H9.

Par l'analyse des données de RMN, les trois groupements (**a**, **b**, **c**) ont pu être liés les uns aux autres. En effet, les protons H3 corrélient avec les carbones C4, C5 et C17 et le couplage H5-C6 confirme que le groupement **c** est positionné à l'extrémité de la chaîne (**Figures 80 et 81, Tableau 28**).



**Figure 80** : Spectres RMN 2D ( $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ) du composé D12 isolé de MOLA1488 à 500 MHz. (A) COSY et (B) HMBC



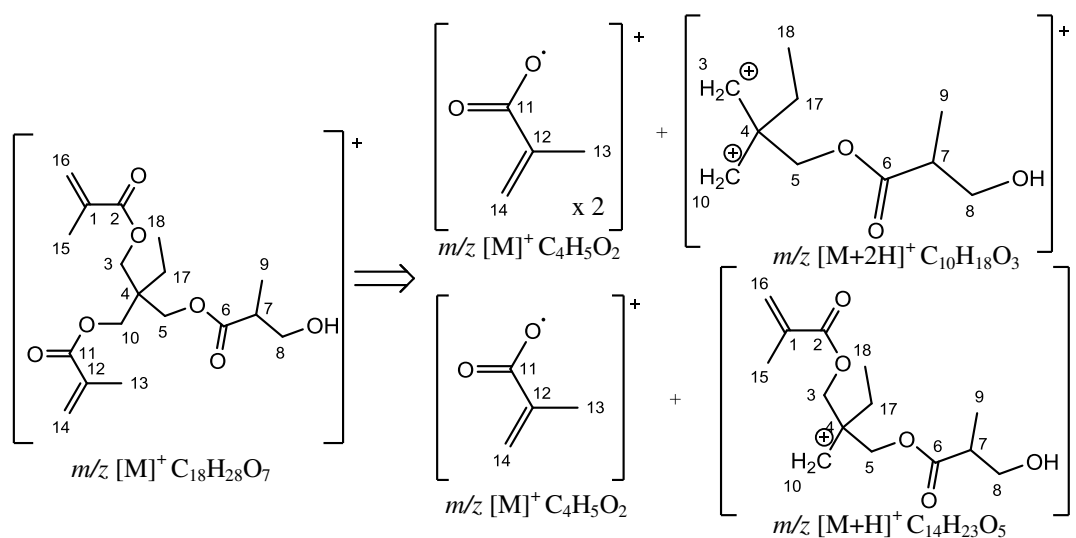
**Figure 81** : Structure du composé D12 isolé de MOLA1488 (flèches : corrélations HMBC et traits : corrélations COSY)

(numérotation choisie arbitrairement) (**nom IUPAC** : 2-[(2-Hydroxy-1-methylpropionyloxy)méthyl]-2-[(isopropenylcarbonyloxy)méthyl]butyl méthacrylate)

**Tableau 28** : Données spectrales RMN (ppm) et corrélations du composé **D12** (CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 500 MHz)

Composé <b>D12</b>				
Position	$\delta_C$	$\delta_H$ (J en Hz) (allure)	HMBC	COSY
<b>1-12</b>	135.83	-	-	-
<b>2-11</b>	166.93	-	-	-
<b>3-10</b>	64.48	4.06 (sl)	C <sub>17</sub> , C <sub>4</sub> , C <sub>5</sub> , C <sub>2-11</sub>	H13-15
<b>4</b>	41.36	-	-	-
<b>5</b>	71.11	3.36-3.41 (m)	C <sub>17</sub> , C <sub>4</sub> , C <sub>3-10</sub> , C <sub>6</sub>	-
<b>6</b>	176.10	-	-	-
<b>7</b>	39.41	2.69-2.73 (m)	C <sub>9</sub> , C <sub>8</sub> , C <sub>6</sub>	H-9, H-8
<b>8</b>	72.98	3.46-3.56 (m)	C <sub>9</sub> , C <sub>7</sub> , C <sub>6</sub>	-
<b>9</b>	13.26	1.13 (10) (d)	C <sub>7</sub> , C <sub>8</sub> et C <sub>6</sub>	H-7
<b>13-15</b>	18.02	1.90 (m)	C <sub>1-12</sub> , C <sub>14-16</sub>	H-3-10, H-14-16
<b>14-16</b>	125.10	6.04 ; 5.54 (m)	C <sub>13-15</sub> , C <sub>1-12</sub> , C <sub>2-11</sub>	H-14-16
<b>17</b>	23.14	1.46-1.51 (m)	C <sub>18</sub> , C <sub>4</sub> , C <sub>3</sub> , C <sub>5</sub>	H-18
<b>18</b>	7.26	0.87 (7.5) (t)	C <sub>17</sub> et C <sub>4</sub>	H-17

La structure ainsi déterminée coïncide avec les fragments obtenus par spectrométrie de masse (HRESIMS). En effet, on observe la perte de deux groupements de formule brute C<sub>4</sub>H<sub>5</sub>O<sub>2</sub> correspondant au motif **a**. De plus, deux autres fragments sont observés : une perte d'un C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O<sub>3</sub> ( $m/z$  [M+Na]<sup>+</sup> 207.0992) correspondant à la perte des motifs **b** et **c** ainsi qu'une perte de C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>O<sub>5</sub> ( $m/z$  [M+Na]<sup>+</sup> 293.1362) correspondant lui à une perte des motifs **b**, **c** ainsi qu'un des deux motifs **a** (en partie) (**Figure 82**).

**Figure 82** : Schéma de fragmentation du composé **D12**

En ce qui concerne le composé **D6**, son identification structurale est en cours. Au vu des premières analyses, il pourrait s'agir d'un dérivé de la dactinomycine et d'après les informations de fragmentation, il présenterait des résidus de type alanine, leucine et isoleucine.

Ainsi, à partir de deux cultures liquides de cette souche, neuf métabolites différents ont été isolés. Parmi ces neuf composés, six ont été identifiés structurellement et trois sont en cours d'identification. A l'heure actuelle, un nouveau métabolite (**D12**) a été isolé à partir de cette souche bactérienne.

#### 2.5.1.2.4. Evaluation des propriétés biologiques

Certains des métabolites isolés à l'issue de l'étude chimique de MOLA1488 (**D2**, **D7**, **D8**, **D9** et **D10**) ont été évalués d'un point de vue cytotoxique au sein de la plateforme ImpACcell (Structure Fédérative de Recherche BIOSIT, Rennes) vis-à-vis de 8 lignées cellulaires (**Tableau 29**). A 25  $\mu\text{M}$ , les composés **D2** et **D7** ont montré des propriétés cytotoxiques non spécifiques avec des taux de viabilité après 48 h d'incubation de 0% alors que les 3 autres métabolites (**D8**, **D9** et **D10**) étaient plus généralistes et également moins cytotoxiques de manière générale. En effet, le composé **D2** a montré une cytotoxicité moindre vis-à-vis de 3 lignées cellulaires (MDA, HCT116 et HaCaT, viabilité comprise entre 20 et 55%) et le composé **D7**, vis-à-vis uniquement d'une lignée cellulaire (HCT116, viabilité de 31%). Au contraire les trois autres métabolites (**D8**, **D9** et **D10**) présentent une cytotoxicité modérée à 25  $\mu\text{M}$  sur 7 ou même les 8 lignées cellulaires testées.

**Tableau 29 : Résultats de la viabilité (%) à 25  $\mu\text{M}$  obtenues sur 8 lignées cellulaires testées au sein de la plateforme ImpACcell (témoins en rouge)**

Viabilité (%) à 25 $\mu\text{M}$ (48h dose unique)								
	HuH7	CaCo-2	MDA-MB-231	HCT116	PC3	NCI-H727	HaCaT	Fibro
<b>D2</b>	0	0	55	20	0	0	40	0
<b>D7</b>	0	0	0	31	0	0	0	0
<b>D8</b>	16	47	33	3	51	48	13	51
<b>D9</b>	23	5	17	6	28	27	4	0
<b>D10</b>	17	34	26	8	41	44	4	0
Roscovitine (IC <sub>50</sub> ) $\mu\text{M}$	21	3	21	10	24	30	6	53
Doxorubicine (IC <sub>50</sub> ) $\mu\text{M}$	63	43	82	22	34	65	88	74
Taxol (IC <sub>50</sub> ) $\mu\text{M}$	36	29	41	9	35	59	11	75
DMSO (IC <sub>50</sub> ) $\mu\text{M}$	100	100	100	100	100	100	100	100

Ainsi, ces résultats confirment ceux obtenus pour l'extrait total AcOEt de MOLA1488. En effet, la cytotoxicité de l'extrait total AcOEt est expliquée en partie par ces 5 métabolites spécifiques isolés et testés de MOLA1488. Il a été reporté que le composé **D8** est capable d'inhiber la cytotoxicité des aflatoxines, avec  $\text{CI}_{50} = 0.2 \text{ mg/mL}$ .<sup>129</sup> De plus, il est à noter l'existence d'une synergie positive (diminution de la  $\text{CI}_{50}$ ) lorsque les composés **D7** et **D8** sont associés.<sup>123</sup>

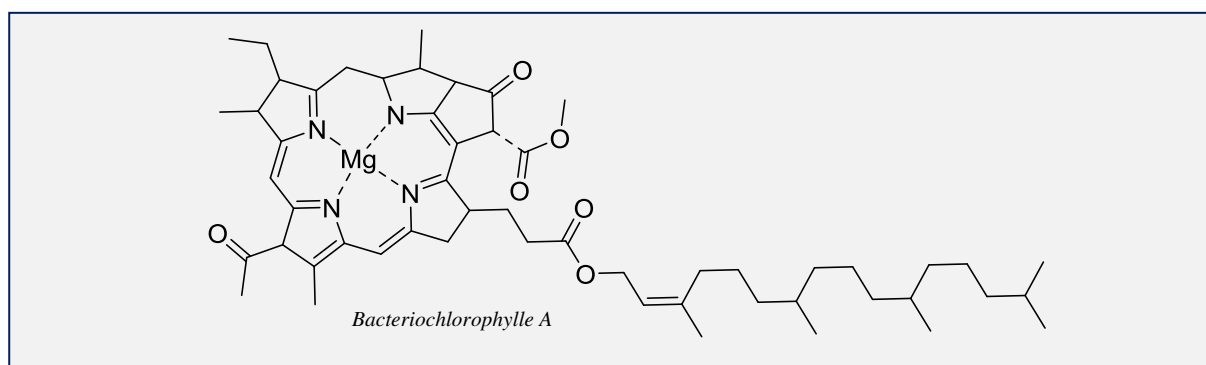
#### 2.5.2. Etude chimique de MOLA1416 : *Hoeflea phototrophica*

##### 2.5.2.1. *Phyllobacteriaceae* : *Hoeflea* sp.

La famille des *Phyllobacteriaceae* appartient au phylum des *Proteobacteria* (plus particulièrement aux *Alphaproteobacteria*) et à l'ordre des *Rhizobiales*. Cette famille comprend 12 genres (d'après Taxonomy Browser, NCBI) : *Aliihoeflea* (3 espèces), *Aminobacter* (56 espèces), *Aquamicrobium* (24 espèces), *Chelativorans* (6 espèces), *Hoeflea* (26 espèces), *Mesorhizobium* (2026 espèces), *Nitrateductor* (51 espèces), *Phyllobacterium* (201 espèces), *Thalassocella* (1 espèce), *Thermovum* (1 espèce) et enfin 59 espèces sont non classifiées.

Les souches bactériennes du genre *Hoeflea* sont des bactéries à coloration Gram négative, ne formant pas de spores, mobiles à cellules rondes et régulières, aérobies et chémoorganotrophiques. Ces

souches sont capables de produire un pigment photosynthétique : la bacteriochlorophylle A ( $\lambda$  367 nm et 775 nm) (**Figure 83**) et contiennent des gènes *pufL* et *pufM* (gènes codant pour des protéines impliquées dans le centre réactionnel photosynthétique).<sup>130,131</sup>



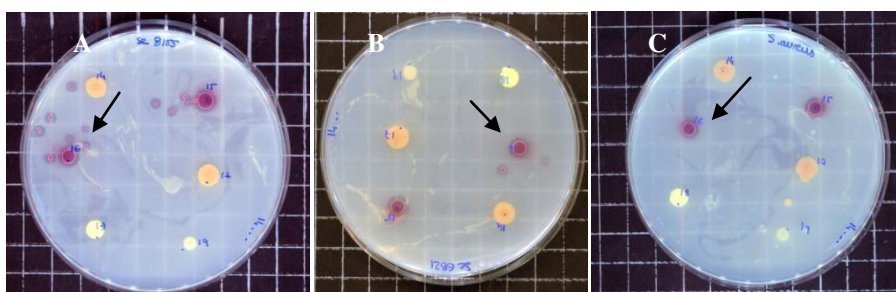
**Figure 83 : Structure chimique de la bactériochlorophylle A**

D'autre part, la production de ce pigment est dépendante de la concentration en sel disponible dans l'environnement. Ainsi, une concentration d'au moins 3 g/L est nécessaire pour l'observation d'une pigmentation. Additionnellement à ce pigment, il a été mis en évidence la production de caroténoïdes et en particulier de sphéroidenones, en se basant sur les propriétés spectrales des extraits organiques ( $\lambda$  482 nm).<sup>130</sup>

Mais, à l'heure actuelle, aucune information n'est disponible sur la diversité chimique de ce genre bactérien montrant l'intérêt de mettre en évidence le potentiel chimique inexploré de *Hoeflea* sp.

#### 2.5.2.1.1. Propriétés biologiques

Cette souche bactérienne cultivable a été isolée de *Lichina pygmaea*. Elle possède des propriétés antibactériennes sur 3 des 5 cibles pathogènes testées (*Staphylococcus aureus* et deux souches de *S. epidermidis*) (**Tableau 30 et Figure 84**).



**Figure 84 : Photographies des tests antimicrobiens effectués par la technique de la gélose molle sur MOLA1416 vis-à-vis de (A) *S. epidermidis* CIP8155, (B) *S. epidermidis* CIP 6821 et (C) *S. aureus* CIP 4.38.**

<sup>129</sup>Yan, P., Song, Y., Sakuno, E., Nakajima, H., Nakagawa, H., and Yabe, K. (2004) *Applied and Environmental Microbiology* 70, 7466–7473.

<sup>130</sup>Biebl, H., Tindall, B. J., Lu, H., Allgaier, M., Wagner-do, I. (2006) *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 821.

<sup>131</sup>Fiebig, A., Pradella, S., Petersen, J., Michael, V., Päuker, O., Rohde, M., Göker, M., Klenk, H.-P., Wagner-Döbler, I. (2013) *Standards in Genomic Sciences* 7, 440.

Après la mise en culture, l'extrait à l'AcOEt a été testé afin de déterminer ces potentielles propriétés cytotoxiques et antibactériennes. Ainsi, cet extrait a montré une  $CI_{50}$  de  $7.20 \pm 0.80 \mu\text{g/mL}$  sur les lignées cellulaires B-16 et de  $8.00 \pm 1.00 \mu\text{g/mL}$  sur les lignées cellulaires HaCaT (**Tableau 30**). Ce même extrait n'a pas montré de propriété antibactérienne vis-à-vis des souches bactériennes testées (**Tableau 31**).

**Tableau 30** :  $CI_{50}$  de l'extrait à l'AcOEt de MOLA1416

Extraits	HaCaT		B-16	
	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Ecart type	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Ecart type
MOLA1416 AcOEt	8.00	1.00	7.20	0.80
Doxorubicine	$2.3 \cdot 10^{-2}$	$0.6 \cdot 10^{-3}$	$2.7 \cdot 10^{-2}$	$1.7 \cdot 10^{-2}$

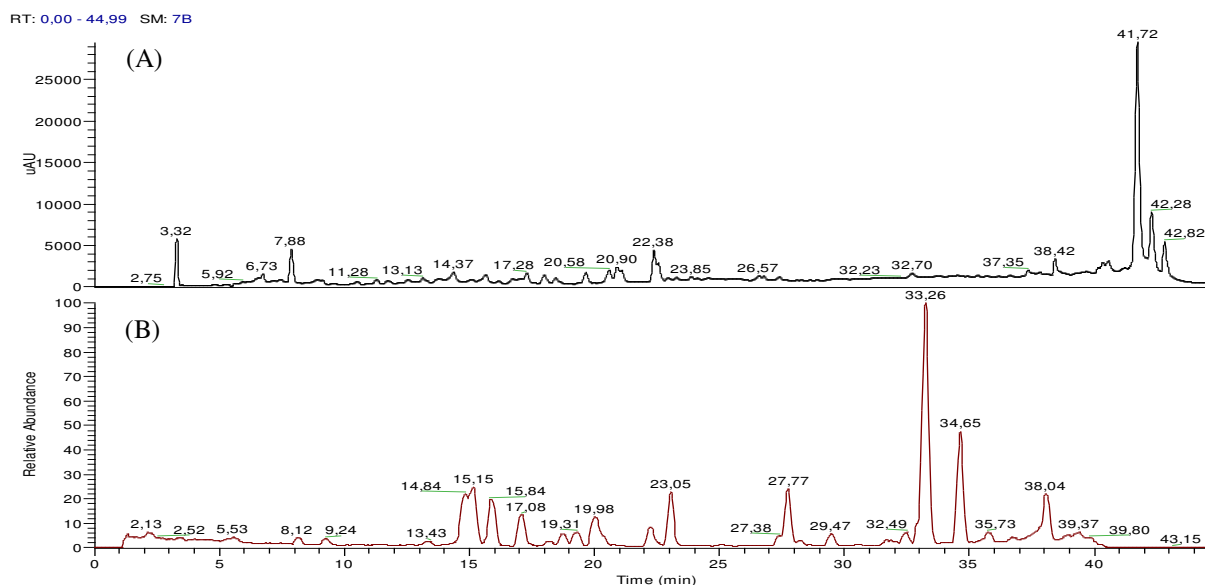
**Tableau 31** : CMI (en  $\mu\text{g/mL}$ ) de l'extrait à l'AcOEt de MOLA1416 sur 5 cibles bactériennes pathogènes

Extraits	<i>S. aureus</i> CIP 4.38	<i>S. epidermidis</i> CIP 81.55	<i>S. epidermidis</i> CIP 68.21	<i>E. coli</i> CIP 53126	<i>P. aeruginosa</i> CIP 100720
MOLA1416 AcOEt	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256
Ofloxacin	600	15	15	7.5	75
Cefatoxime	75	30	22.5	150	375
Chloramphénicol	600	300	225	> 1500	> 600

Ainsi, ces deux tests biologiques préliminaires sur l'extrait total à l'AcOEt de MOLA1416 mettent en évidence la présence de molécules intéressantes, en particulier possédant des propriétés cytotoxiques. Cependant, les propriétés antibactériennes de l'extrait AcOEt de MOLA1416 qui ont été mis en évidence par la technique de la gélose molle (**Figure 84**) n'ont pas été retrouvées au sein de l'extrait AcOEt de MOLA1416 aux concentrations testées. Les hypothèses précédemment citées pour MOLA1488 peuvent être également appliquées.

#### 2.5.2.1.2. Analyses LC-ESI-MS/MS

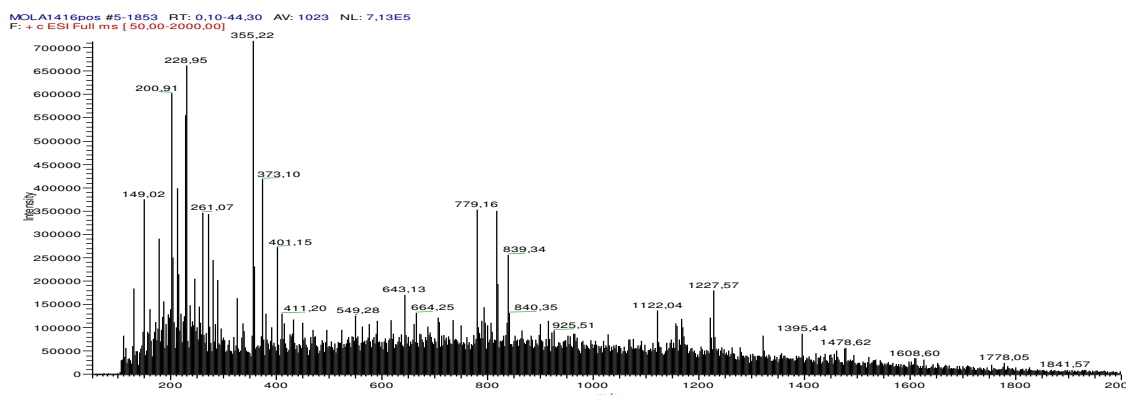
L'analyse de cet extrait par LC-ESI-MS/MS a permis de mettre en évidence la présence d'un certain nombre de composés aussi bien au niveau des chromatogrammes UV que ceux de masse (rapport de  $m/z$  allant de 50 à 2000 uma) (**Figure 85**).



**Figure 85 :** Chromatogrammes UV (A) et de masse en mode positif (B) de l'extrait AcOEt de MOLA1416

Les données spectrales UV de ces métabolites n'ont montré aucune caractéristique particulière. Par conséquent, l'analyse par LC de l'extrait ne permet pas de mettre en évidence la présence de groupements particuliers au sein des métabolites produits.

A partir du spectre de masse enregistré, il en résulte une large gamme de métabolites allant des faibles poids moléculaires ( $[M+H]^+$   $m/z$  149 uma) au relativement haut poids moléculaires ( $[M+H]^+$   $m/z$  1227 uma). Cependant, la plupart des métabolites présents sont localisés dans une gamme de masse de relativement faible poids moléculaire comprise entre  $[M+H]^+$   $m/z$  100 et 400 uma, à l'exception de quelques métabolites (3) ayant une masse comprise entre  $[M+H]^+$   $m/z$  750 et 850 uma. (Figure 86).



**Figure 86 :** Spectre de masse ( $[M+H]^+$   $m/z$ ) de l'extrait AcOEt de MOLA1416

Ainsi, cette souche bactérienne contient plutôt (dans les conditions utilisées) des métabolites de faible poids moléculaire.

### 2.5.2.1.3. *Isolement et identification des métabolites*

Afin de caractériser les métabolites spécialisés produits par cette souche (actifs comme inactifs) les extraits à l'AcOEt obtenus après culture liquide de cette souche ont été séparés par diverses techniques séparatives.

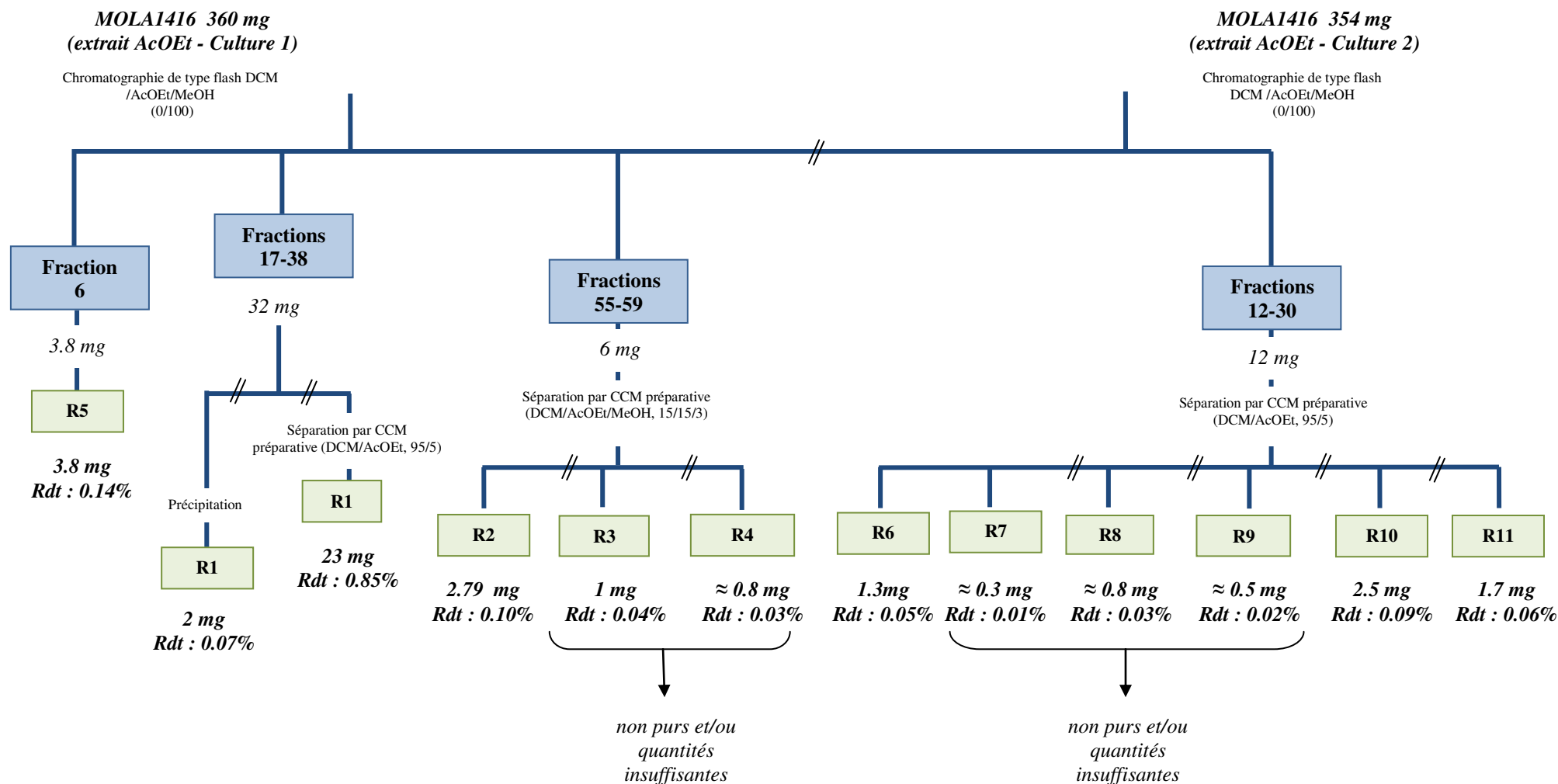
Les extraits à l'AcOEt (360 mg et 354 mg) obtenus lors des deux cultures ont été soumis à une chromatographie de type flash sur gel de silice (SiO<sub>2</sub>, 25 g, Biotage). Des dépôts solides d'environ 100 mg ont été effectués. La phase mobile choisie est constituée comme précédemment d'un mélange binaire DCM/AcOEt puis AcOEt/MeOH (Cf. Matériels & Méthodes) ce qui a abouti à l'obtention de 150 fractions de 10 mL.

Suite à la première culture et chromatographies de type flash, trois fractions intéressantes ont été regroupées et étudiées : 6 (3.8 mg), 17-38 (32 mg) et 55-59 (6 mg). La fraction 55-59 a été soumise à des CCM préparatives (DCM/AcOEt/MeOH, 15/15/3, v/v/v). À partir de la fraction 55-59, trois composés (**R2** à **R4**) dont un majoritaire a été isolé (**R2**). La fraction 17-38 constituée quasi exclusivement d'un composé a permis d'obtenir dans un premier temps 2 mg du composé **R1** par précipitation. Le reste de la fraction a été soumis à une CCM préparative (DCM/AcOEt, 95/5) et a permis d'obtenir 23 mg supplémentaires du composé **R1** (Rf 0.73, rose foncé dans le visible). La fraction 6, constituée uniquement d'un composé, a permis d'obtenir 3.8 mg du composé **R5**.

À partir de la deuxième culture liquide de MOLA1416, trois composés différents (**R6**, **R9** et **R10**) et supplémentaires ont été isolés. L'extrait à l'AcOEt a également été soumis à une chromatographie de type flash (DCM/AcOEt puis AcOEt/MeOH) et une fraction intéressante (12-30) (12 mg) contenant six composés a été soumise à une CCM préparative (DCM/AcOEt, 95/5). À l'issue de cette deuxième séparation, trois des six composés : **R5**, **R9** et **R10** (Rf 0.78, 0.54 et 0.34 respectivement) ont été isolés en quantité et pureté satisfaisantes.

Comme précédemment, les produits isolés ont été analysés par RMN, LC/MS et HRESIMS et leurs propriétés biologiques (dépendantes des quantités isolées) ont été évaluées (propriétés cytotoxiques en particulier). L'ensemble des fractionnements et purifications est résumé **Figure 87**.





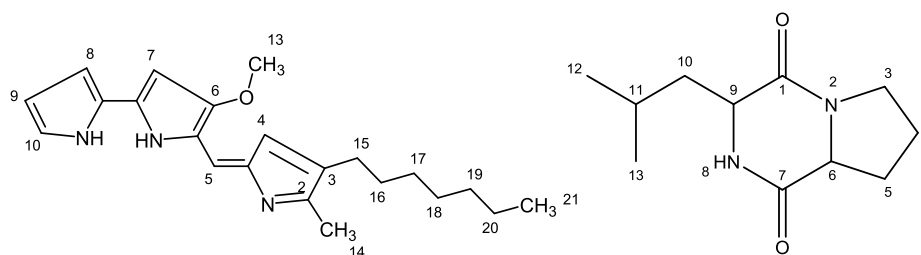
**Figure 87 :** Schéma de séparation et d'isolement des composés issus des deux cultures de MOLA1416 réalisées dans le milieu MB (Marine Broth)

(Rendement exprimé en fonction des 2.7 L de culture réalisés)

Suite à ces deux cultures, onze composés (**R1** à **R11**) ont été isolés à partir de l'extrait à l'AcOEt par différentes techniques chromatographiques. Parmi ces onze composés, seulement six ont pu être identifiés structurellement. Les cinq autres composés n'ont pas pu l'être, cela lié à une quantité trop faible et/ou à une pureté non satisfaisante.

Par conséquent, les composés **R1**, **R2**, **R5**, **R6**, **R10** et **R11** ont été isolés en quantité et pureté satisfaisante pour être identifiés structurellement comme précédemment.

Parmi ces six composés isolés, deux d'entre eux (**R1**, C<sub>22</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O : **25 mg**, et **R5** C<sub>11</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : **3.8 mg**) ont déjà été décrits dans la littérature. Il s'agit d'un alcaloïde (**R1** : 6-méthoxy 2-méthyl 3-heptylprodiginine)<sup>132</sup> et à nouveau de la même dicétopipérazine (**R2** : cyclo-(L-Leu,L-Pro)<sup>118,119</sup>, (**Figure 88**). Des composés proches du composé **R1** (chaines alkyles plus courtes) ont montré des propriétés cytotoxiques (contre plus de 60 lignées cellulaires humaines cancéreuses).<sup>132</sup>



**Figure 88** : Structures de composés **R1** et **R5** isolés de **MOLA1416**

Les données RMN (<sup>1</sup>H et DEPT) obtenues pour **R1** sont décrites dans le **Tableau 32** ci-dessous :

**Tableau 32** : Données spectrales (ppm) du composé **R1** dans le CDCl<sub>3</sub> à 500 MHz

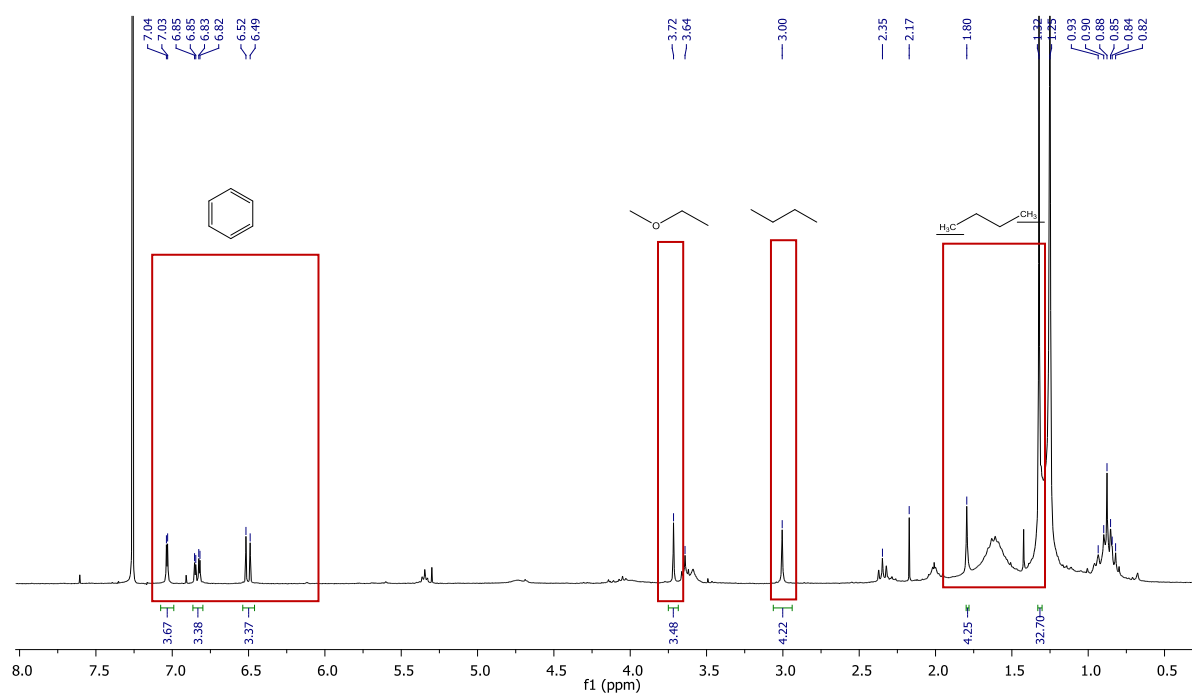
Composé <b>R1</b>		
Position	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub> (J en Hz) (allure)
<b>2</b>	146.75	-
<b>3</b>	128.23	-
<b>4a</b>	124.86	-
<b>4</b>	128.13	6.63 (2.5) (d)
<b>5a</b>	147.38	-
<b>5</b>	116.00	6.90 (s)
<b>6</b>	165.4	-
<b>7a</b>	120.39	-
<b>7</b>	92.8	6.03 (2.5) (d)
<b>8</b>	116.98	6.86-6.89 (m)
<b>8a</b>	121.98	-
<b>9</b>	111.71	6.29-6.31 (m)
<b>10</b>	126.94	7.23 (1.2 ; 2.5 ; 5.8) (ddd)
<b>13</b>	58.44	3.96 (s)
<b>14</b>	12.20	2.49 (s)
<b>15</b>	30.12	2.34 (7.5) (t)
<b>16-19</b>	25.38-25.45	1.19-1.27 (m)
<b>20</b>	22.65	1.53 (s)
<b>21</b>	13.84	0.83 (7.5) (t)

Outre ces deux composés connus, un troisième a été isolé et caractérisé. D'après les données de HRESIMS, ce composé est de formule brute suivante C<sub>50</sub>H<sub>66</sub>O<sub>8</sub>, soit une MM de 795 g.mol<sup>-1</sup>.

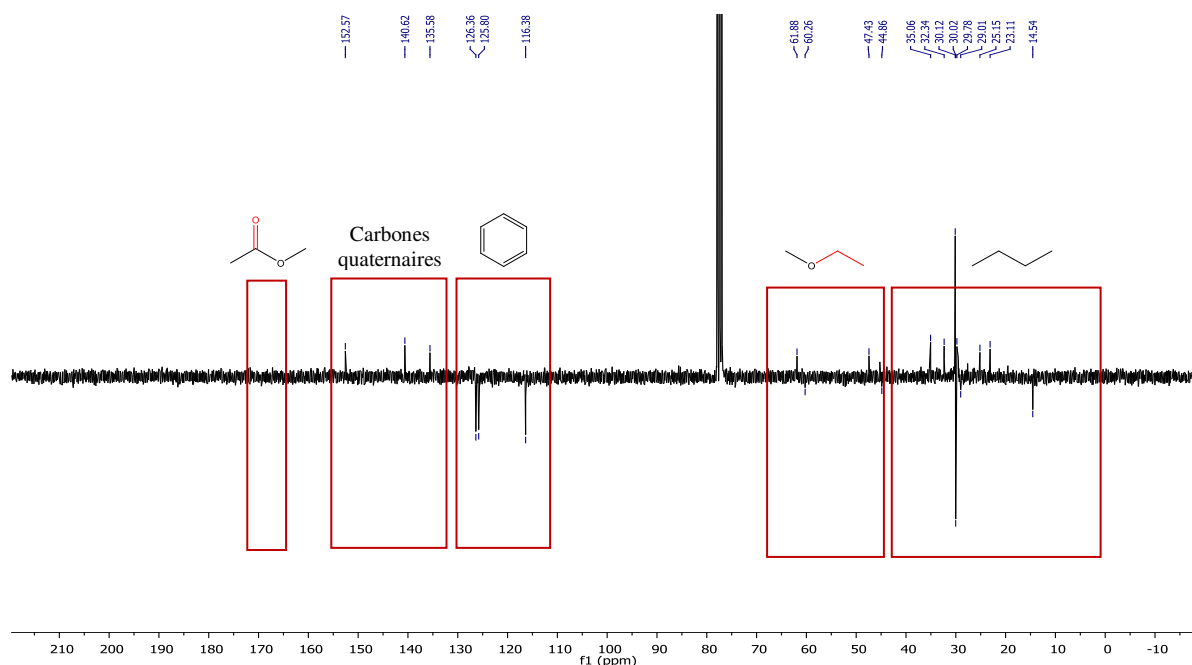
<sup>132</sup>Soliev, A. B. (2012) Pigmented bioactive compounds from marine bacteria and their mechanisms of action involved in cytotoxicity Université de Kochi, Japon.

D'après les données bibliographiques, ce composé ou ces dérivés ont fait l'objet de brevets et sont utilisés dans l'industrie en tant que protecteur des encres d'imprimante à la lumière. Il s'agit du benzenepropanoic acid, 4-(1,1-dimethylethyl)-β-[4-(1,1-dimethylethyl)-3- hydroxyphenyl]-3-hydroxy-β-methyl-1,2-ethanediyl ester.

Les analyses RMN-<sup>1</sup>H, jmod et 2D (COSY, TOCSY, HSQC et HMBC) (500 et 125 MHz) ont été réalisées dans le CDCl<sub>3</sub>. Les spectres RMN-<sup>1</sup>H et jmod du composé **R11** révèlent la présence des fonctions suivantes : deux groupements carbonyles ( $\delta_C$  171.22), douze méthyles aliphatiques ( $\delta_C$  29.70 ;  $\delta_H$  1.31), de deux autres méthyles ( $\delta_C$  42.21 ;  $\delta_H$  1.79), de douze protons aromatiques regroupés par quatre ( $\delta_C$  125.38 et  $\delta_H$  6.84 ;  $\delta_C$  126.06 et  $\delta_H$  7.07 ;  $\delta_C$  115.82 et  $\delta_H$  6.51), de deux CH<sub>2</sub> aliphatiques ( $\delta_C$  46.82 et  $\delta_H$  3.03) ainsi que la présence de deux groupements OCH<sub>2</sub> ( $\delta_C$  61.39 ;  $\delta_H$  3.74) (**Figure 89** et **90**).

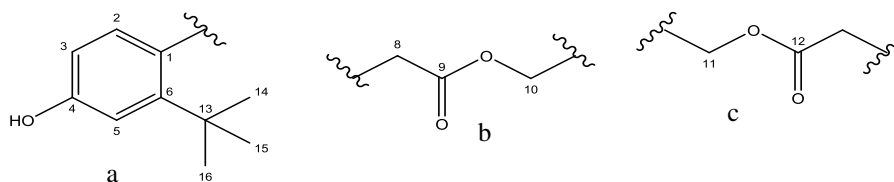


**Figure 89** : Spectre <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) du composé R11 isolé de MOLA1416 à 500 MHz



**Figure 90 : Spectre jmod (CDCl<sub>3</sub>) du composé R11 isolé de MOLA1416 à 125 MHz**

Ces données spectrales ont permis d'identifier la structure du composé **R11**. Ce dernier est constitué principalement de 3 fragments (a, b et c) dont les déterminations structurales sont détaillées par la suite (**Figure 91**).



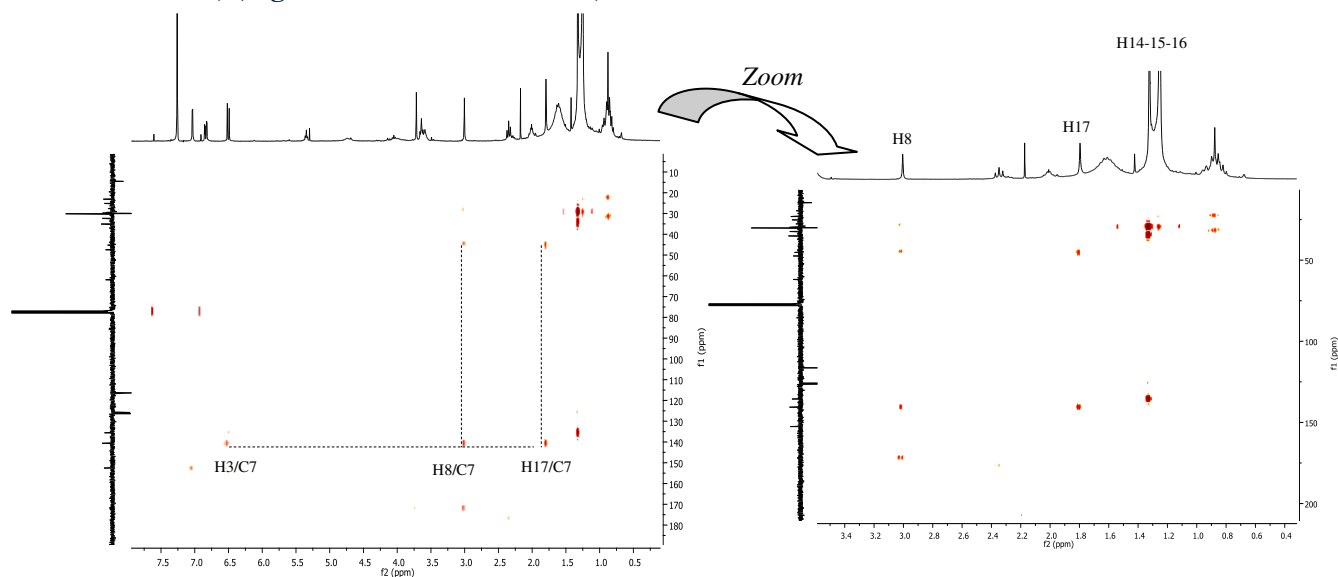
**Figure 91 : Structure des fragments (a, b et c) du composé R11**

Le fragment **a** est constitué d'un *tert*-butyle  $\delta_{\text{H}}$  1.31 (H-14, H-15 et H-16,  $\delta_{\text{C}}$  29.70), de trois protons aromatiques à  $\delta_{\text{H}}$  6.51, 6.84 et 7.07 (H-2, H-3 et H-6,  $\delta_{\text{C}}$  125.38, 115.82 et 126.05) et d'une fonction hydroxyle portée par un atome de carbone à  $\delta_{\text{C}}$  152.37. Les corrélations observées en RMN 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC montrent celles entre les trois groupes méthyles constituant le *tert*-butyle avec un atome de carbone quaternaire C13 ( $\delta_{\text{C}}$  135.17).

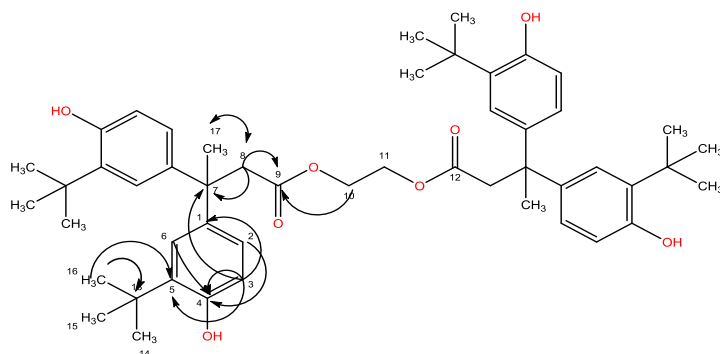
Le fragment **b** contient un groupement CH<sub>2</sub> δ<sub>H</sub> 3.03 (H-10, δ<sub>C</sub> 46.82), un carbonyle (δ<sub>C</sub> 171.22) ainsi qu'un groupement O-CH<sub>2</sub> δ<sub>H</sub> 3.74 (H-10 δ<sub>C</sub> 61.39). Les données 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC mettent en évidence les corrélations du H-8 avec l'atome de carbone d'un groupe méthyle aliphatique δ<sub>C</sub> 28.68 (H-17, δ<sub>H</sub> 1.79), un atome de carbone quaternaire C7 (δ<sub>C</sub> 139.97) et le C9 (δ<sub>C</sub> 171.22).

Enfin, le fragment **c** est constitué des mêmes groupements que le fragment **b** ainsi que des mêmes principales corrélations aux vues des données de RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC confirmant la symétrie de la molécule.

Par l'analyse des données de RMN, les trois groupements (**a**, **b**, **c**) ont pu être liés les uns aux autres. En effet, le carbone quaternaire C7 est corrélé aussi bien à un des H aromatiques  $\delta_H$  6.51 (H-3  $\delta_C$  115.82.17), au CH<sub>2</sub> du groupement **b** ou **c** ou au groupe méthyle aliphatique  $\delta_H$  1.79 (H-17,  $\delta_C$  28.68) (**Figures 92 et 93, Tableau 33**).



**Figure 92** : Spectre HMBC du composé R11 isolé de MOLA1416 à 500 MHz

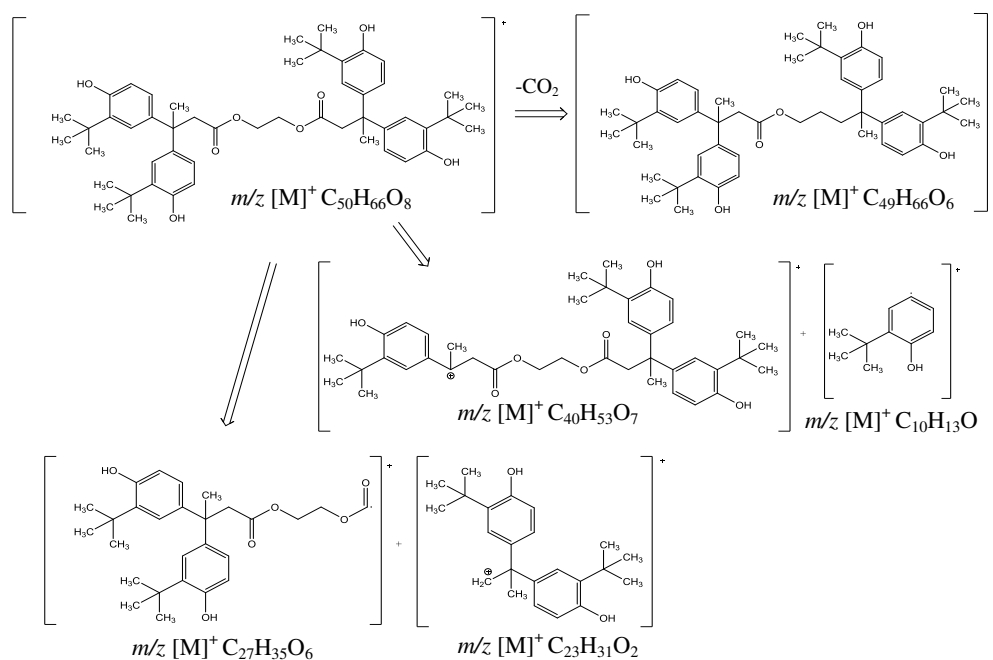


**Figure 93** : Structure du composé R11 isolé de MOLA1416 (flèches : corrélations HMBC) (numérotation choisie arbitrairement)

**Tableau 33** : Données spectrales RMN (ppm) et corrélations du composé R11 isolé de MOLA1416 (CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 500 MHz)

Composé R11			
Position	$\delta_C$	$\delta_H$ (J en Hz) (allure)	HMBC
<b>1</b>	140.69	-	-
<b>2</b>	125.38	6.84 (2.4 ; 8.3) (dd)	C <sub>4</sub>
<b>3</b>	115.82	6.51 (8.3) (d)	C <sub>4</sub> , C <sub>5</sub> , C <sub>1</sub> , C <sub>7</sub>
<b>4</b>	152.37	-	-
<b>5</b>	135.17	-	-
<b>6</b>	126.05	7.07 (2.4) (d)	C <sub>4</sub>
<b>7</b>	139.97	-	-
<b>8</b>	46.82	3.03 (s)	C <sub>9</sub> , C <sub>17</sub> , C <sub>7</sub>
<b>9-12</b>	171.22	-	-
<b>10-11</b>	61.39	3.74 (s)	C <sub>9-12</sub>
<b>13</b>	31.81	-	-
<b>14-15-16</b>	29.70	1.31 (s)	C <sub>5</sub> , C <sub>13</sub> , C <sub>14-15-16</sub>
<b>17</b>	28.68	1.79 (s)	C <sub>7</sub>

La structure ainsi déterminée coïncide avec les fragments obtenus par spectrométrie de masse (HRESIMS). En effet, on observe la perte d'un hydroxyphényl-*tert*-butyle ( $C_{10}H_{13}O$ ), une perte d'un groupement  $CO_2$  ainsi qu'une perte de 339 uma ( $C_{23}H_{31}O_2$ ) correspondant à la perte des deux noyaux hydroxyphényl-*tert*-butyle ainsi qu'un groupement  $C-CH_3-CH_2$  (**Figure 94**).



**Figure 94** : Schéma de fragmentation du composé **R11**

Le métabolite **R11** isolé a été jusqu'à présent uniquement synthétisé et non produit naturellement. En ce qui concerne les composés **R5**, **R6** et **R10**, leurs identifications structurales sont en cours.

Ainsi, à partir de deux cultures liquides de cette souche, six métabolites différents ont été isolés. Parmi ces six composés, trois ont été identifiés structurellement et trois sont en cours d'identification (deux plus polaires (**R6** :  $C_{12}H_{10}O_4$  et **R10** :  $C_{14}H_{22}O_5$ ) que le composé **R11** et un plus apolaire (**R5** :  $C_{18}H_{26}O_6$ ). A l'heure actuelle, une source naturelle nouvelle du métabolite **R11** a été mise en évidence : *Hoeflea phototrophica* (MOLA1416).

#### 2.5.2.1.4. Evaluation des propriétés biologiques

Le composé **R2** correspondant au composé **D8** isolé de MOLA1488 a déjà été testé. Le composé **R1** a montré une cytotoxicité sur les lignées cellulaires HaCaT et B-16 intéressante (**Tableau 34**) allant dans le même sens que celle décrite dans la littérature sur un panel de 60 lignées de cellules tumorales humaines ( $CI_{50}$  14 nM).<sup>132</sup>

**Tableau 34 :  $CI_{50}$  du composé R1 isolé de MOLA1416**

Extraits	HaCaT		B-16	
	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Ecart type	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Ecart type
<b>R1</b>	$2.6 \cdot 10^{-2}$	$1.3 \cdot 10^{-2}$	0.6	0.07
<b>Doxorubicine</b>	$2.3 \cdot 10^{-2}$	$0.6 \cdot 10^{-3}$	$2.7 \cdot 10^{-2}$	$1.7 \cdot 10^{-2}$

L'autre composé (**R11**) isolé et identifié n'a pas à l'heure actuelle été soumis à une évaluation biologique.

## 2.6. Etudes comparatives par « Molecular Network »

### 2.6.1. Profilages chimiques et propriétés biologiques

Dix souches ont été sélectionnées : 8 de la collection MOLA (1488, 1416, 1448, 1450, 1528, 1554, 1522 et 1545) (Banyuls/Mer) et 2 de la collection DP (1 et 94) (Rennes/Autriche) selon leur potentiel chimique, leur abondance ou également vis-à-vis de l'originalité de la souche bactérienne (nouvelle espèce, similarité avec le gène de l'ARNr 16S inférieure à 96%) pour une étude de profilage chimique plus générale.

Le potentiel cytotoxique et antibactérien des extraits obtenus pour chacune de ces souches a été évalué et également un profilage chimique de ces 10 souches a été analysé par LC/MS et comparé entre eux par la réalisation de « molecular network ».<sup>133,134</sup> De plus, les métabolites produits par ces différentes souches bactériennes ont été associés lorsque cela était possible à une famille ou à un type de molécules isolées lors de l'étude chimique des deux souches bactériennes précédemment décrites et/ou disponibles dans la base de données GnPs (1640 métabolites).

#### 2.6.1.1. Propriétés biologiques

Les propriétés biologiques (cytotoxiques et antibactériennes) des extraits AcOEt de ces 10 souches bactériennes ont été évaluées. Les **Tableaux 35** et **36** présentent les résultats obtenus pour ces propriétés biologiques.

<sup>133</sup>Bruns, N., Glukhov, E., Wodtke, A., and Felicio, R. De. (2014) *NIH Journal of Natural Products* 76, 1686–1699.

<sup>134</sup>Garg, N., Kapon, C., Lim, Y. W., Koyama, N., Vermeij, M. J. A., Conrad, D., Rohwer, F., and Dorrestein, P. C. (2014) *International Journal of Mass Spectrometry* (sous presse)

**Tableau 35 : Résultats de la  $CI_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) sur HaCaT et B16-F10 des dix extraits à l'AcOEt bactériens (48h d'incubation)**

Extraits AcOEt	Espèces	HaCaT	B-16
		$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
<b>MOLA1416</b>	<i>Hoeflea</i> sp.	$8.00 \pm 1.0$	$7.20 \pm 0.8$
<b>MOLA1488</b>	<i>Streptomyces</i> sp.	$0.25 \pm 0.1$	$0.33 \pm 0.16$
<b>MOLA1448</b>	<i>Nocardioides</i> sp.	$92.00 \pm 17.0$	$83.00 \pm 10.0$
<b>MOLA1450</b>	<i>Cellulomicrobium</i> sp.	$27.00 \pm 9.0$	$36.00 \pm 4.0$
<b>MOLA1522</b>	<i>Nocardioides</i> sp.	$165.00 \pm 10.0$	$250.00 \pm 10.0$
<b>MOLA1528</b>	<i>Paraoskovia</i> sp.	$> 400.00$	$> 400.00$
<b>MOLA1545</b>	<i>Microbacterium</i> sp.	$> 400.00$	$> 400.00$
<b>MOLA1554</b>	<i>Paraoskovia</i> sp.	$190.00 \pm 35.0$	$215 \pm 35.0$
<b>DP1</b>	<i>Streptomyces</i> sp.	$210.00 \pm 45.0$	$180.00 \pm 58.0$
<b>DP94</b>	<i>Nocardia</i> sp.	$25.00 \pm 2.0$	$23.00 \pm 3.0$
<b>Doxorubicine</b>		$2.3 \cdot 10^{-2} \pm 0.6 \cdot 10^{-3}$	$2.7 \cdot 10^{-2} \pm 1.7 \cdot 10^{-2}$

Les résultats obtenus ont mis en évidence la présence de trois catégories d'extraits à l'AcOEt de ces dix souches bactériennes en fonction de leur cytotoxicité en lien avec la valeur de leur  $CI_{50}$ . En effet, les extraits à l'AcOEt de MOLA1528 et MOLA1545 ne se sont pas révélés cytotoxiques ( $CI_{50}$  supérieure à  $400 \mu\text{g/mL}$ ), les extraits de MOLA1448, DP1, MOLA1522 et MOLA1554 présentent une cytotoxicité modérée ( $400 \mu\text{g/mL} < CI_{50} < 40 \mu\text{g/mL}$ ) alors que les extraits AcOEt de MOLA1450, MOLA1488, MOLA1416 et DP94 ont montré des propriétés cytotoxiques significatives avec une  $CI_{50}$  inférieure à  $30 \mu\text{g/mL}$ . Cependant, aucun de ces extraits n'a démontré d'activité sélective spécifique vis-à-vis de l'une de ces deux lignées cellulaires.

**Tableau 36 : CMI des extraits à l'AcOEt issus des dix souches bactériennes testées**

Extraits AcOEt	<i>S. aureus</i> CIP 4.38	<i>S. epidermidis</i> CIP 81.55	<i>S. epidermidis</i> CIP 68.21	<i>E. coli</i> CIP 53126	<i>P. aeruginosa</i> CIP 100720
<b>MOLA1416</b>	$> 256$	$> 256$	$> 256$	$> 256$	$> 256$
<b>MOLA1488</b>	$> 256$	<b>256</b>	<b>256</b>	$> 256$	$> 256$
<b>MOLA1448</b>	$> 256$	$> 256$	$> 256$	$> 256$	$> 256$
<b>MOLA1450</b>	$> 256$	$> 256$	$> 256$	$> 256$	$> 256$
<b>MOLA1522</b>	$> 256$	$> 256$	$> 256$	$> 256$	$> 256$
<b>MOLA1528</b>	$> 256$	$> 256$	$> 256$	$> 256$	$> 256$
<b>MOLA1545</b>	$> 256$	$> 256$	$> 256$	$> 256$	$> 256$
<b>MOLA1554</b>	$> 256$	$> 256$	$> 256$	$> 256$	$> 256$
<b>DP1</b>	$> 256$	$> 256$	$> 256$	$> 256$	$> 256$
<b>DP94</b>	$> 256$	$> 256$	$> 256$	$> 256$	$> 256$
<b>Ofloxacin</b>	600	15	15	7.5	75
<b>Cefatoxime</b>	75	30	22.5	150	375
<b>Chloramphénicol</b>	600	300	225	$> 1500$	$> 600$

En ce qui concerne les propriétés antibactériennes de ces extraits, une CMI a été mise en évidence uniquement pour l'extrait acétate d'éthyle de MOLA1488. Dans les conditions utilisées, une CMI de  $256 \mu\text{g/mL}$  sur *Staphylococcus epidermidis* CIP 68.21 et CIP 81.55 a été mise en évidence. Ainsi, la quasi-totalité (9/10 des extraits) des souches présentent potentiellement des propriétés antibactériennes avec une CMI supérieure à  $256 \mu\text{g/mL}$ .



Par conséquent, ces différents souches bactériennes ont la capacité de produire des métabolites actifs et notamment cytotoxiques et présentent donc un intérêt dans la recherche de métabolites bioactifs.

Afin d'essayer de mettre en relation l'activité avec un ou des types structuraux et soulever la présence potentielle de métabolites bioactifs nouveaux, une approche de déréplication par LC-ESI-MS/MS a été réalisée et les analyses ont été effectuées à l'aide de la plateforme GnPs et du logiciel de visualisation Cytoscape.

#### **2.6.1.2. Profilages chimiques et déréplication**

Les analyses ont été réalisées en considérant les souches bactériennes par famille, à l'exception des familles *Nocardiaceae* et *Nocardoidaceae* qui ont été analysées ensemble. Ainsi, les similarités chimiques entre espèces appartenant à une même famille ou proche ont pu être mises en évidence. L'ensemble des spectres de masses de ces 10 souches bactériennes ont été analysés de la manière suivante :

##### *Actinobacteria* :

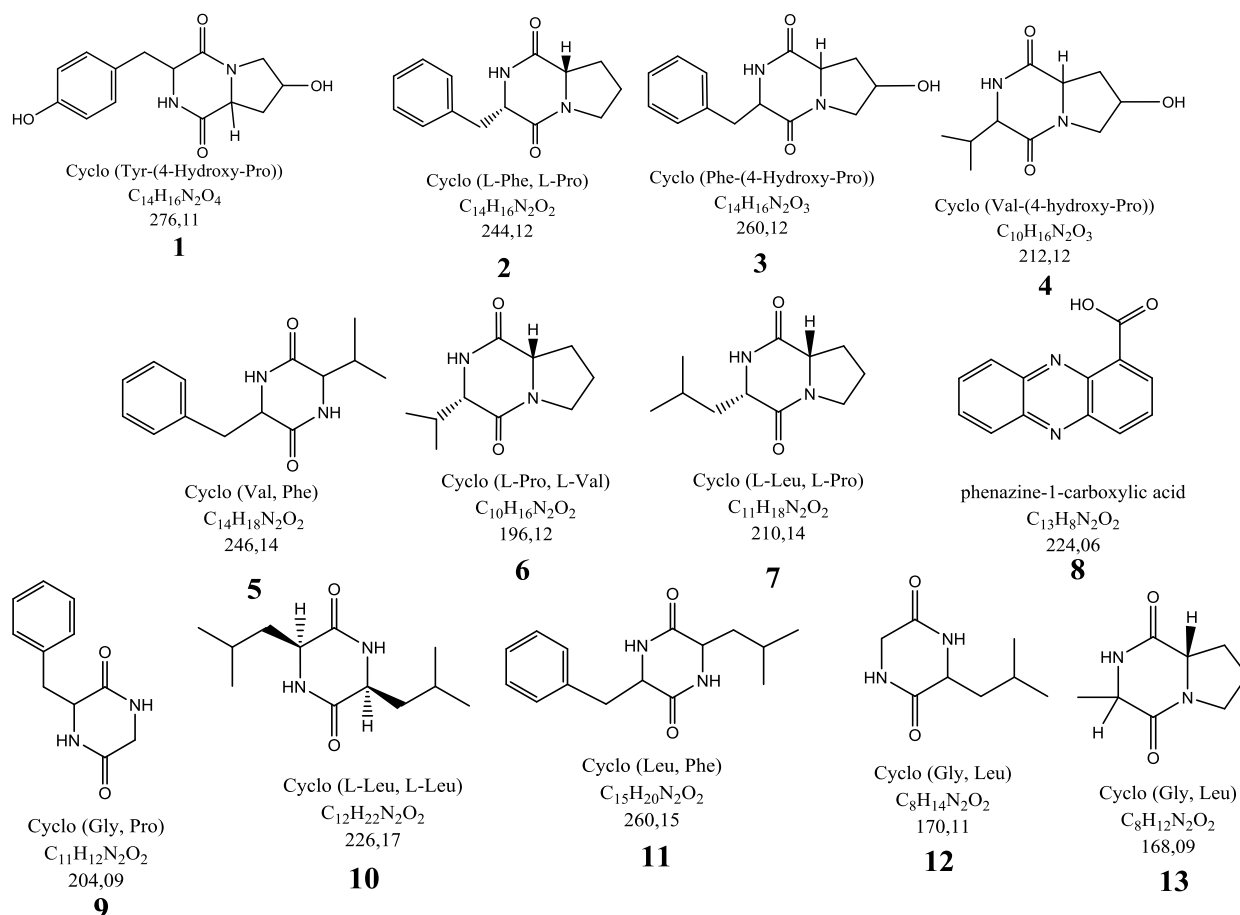
- Groupe 1 : *Streptomycetaceae* (DP1 et MOLA1488)
- Groupe 2 : *Nocardoidaceae* et *Nocardiaceae* (DP94, MOLA1448 et MOLA1522)
- Groupe 3 : *Cellulomonadaceae* (MOLA1554 et MOLA1528)
- Groupe 4 : *Micrococcaceae* (MOLA1545)
- Groupe 5 : *Promicromonosporaceae* (MOLA1450)

##### *Proteobacteria* :

- Groupe 6 : *Phyllobacteriaceae* (MOLA1416)

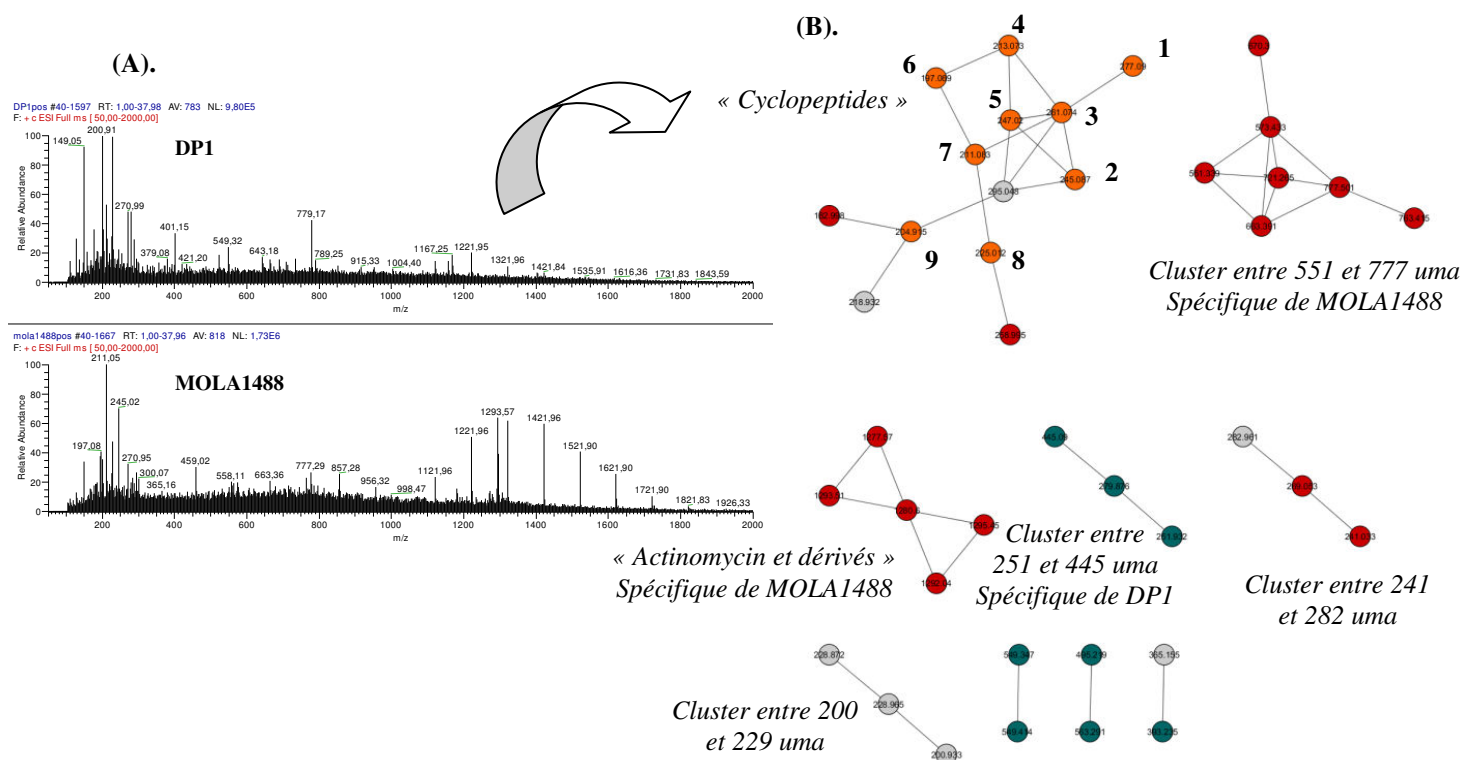
Les analyses ont été réalisées à partir de spectres de masse acquis en mode positif et négatif. Cependant, parmi les métabolites référencés dans la base de données GnPs (1640 métabolites), aucune correspondance avec un métabolite présent dans les extraits à l'AcOEt de ces 10 souches bactériennes n'a été observée avec les données acquises en mode d'ionisation négatif. Les résultats obtenus en mode d'ionisation positif ont été uniquement présentés.

De manière générale, divers métabolites, plus ou moins nombreux selon les groupes considérés précédemment, ont été identifiés. Les métabolites identifiés à partir de la base de données appartiennent pour 12/13 d'entre eux à la famille structurale des cyclopeptides et plus particulièrement aux dicétopipérazines (**Figure 95**).



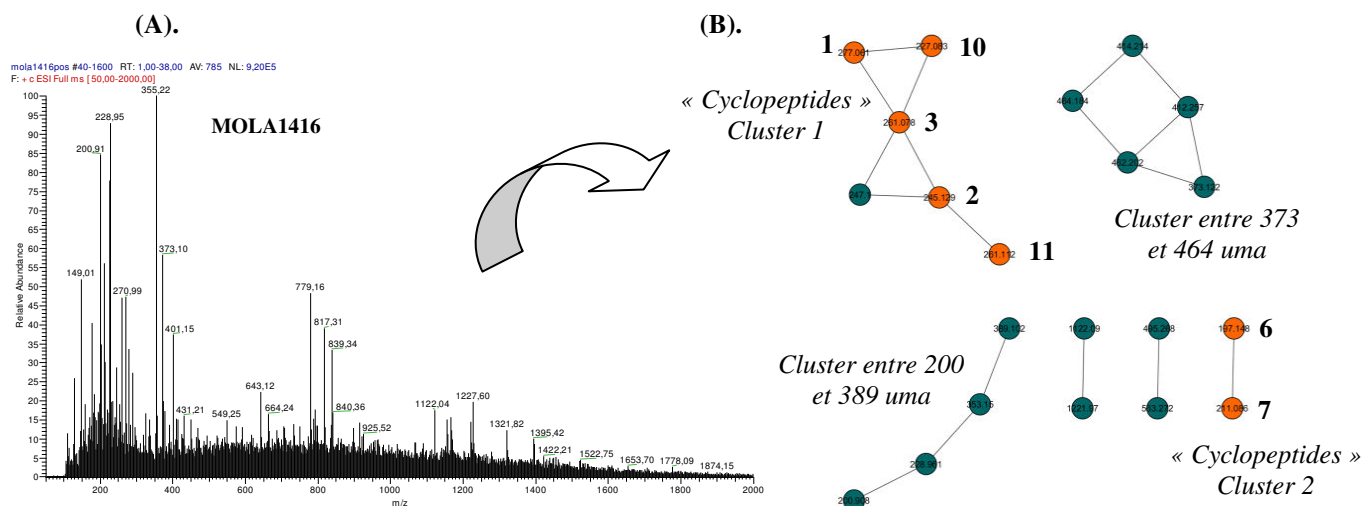
**Figure 95 : Structures de composés identifiés à partir de la base de données GnPs**

En se focalisant sur chaque groupe précédemment défini, l'analyse a permis d'identifier au sein des deux extraits à l'AcOEt de MOLA1488 et DP1 (*Streptomyetaceae*) (Groupe 1), la présence de 8 cyclopeptides (**1-7** et **9**) et d'une phenazine (**8**) et donc d'un cluster particulier (**Figure 94**). Parmi ces 9 métabolites, 2 d'entre-eux sont spécifiques de MOLA1488 (**1** et **5**) et 1 est spécifique de DP1 (**9**). Ceci a également été confirmé lors de l'étude chimique de MOLA1488 par l'isolement et l'identification des métabolites **2** et **7**. De plus, à partir des métabolites isolés lors de l'étude chimique de MOLA1488, un cluster a pu être identifié comme « actinomycine et dérivés » avec des  $[M+H]^+$   $m/z$  variant de 1277 à 1295 uma indiquant ainsi la présence potentielle de 5 métabolites de type actinomycine ou de structure chimique proche. Cependant, le métabolite **D12** isolé lors de l'étude chimique n'a pas été mis en évidence au cours de ces analyses lié à une non ionisation du composé dans les conditions utilisées. D'autre part, d'autres clusters de métabolites non identifiés spécifiques ou communs à l'une de ces deux souches ont été ainsi mis en évidence (clusters de  $[M+H]^+$   $m/z$  compris entre 551 et 777, entre 241 et 282, entre 251 et 445 et aussi entre 200 et 229 uma par exemple) (**Figure 96**).



**Figure 96 :** (A) Spectres de masses ( $[M+H]^+$   $m/z$ ) de DP1 et MOLA1488 et (B) représentation cytoscape des interconnexions des spectres de masse de ces deux espèces bactériennes

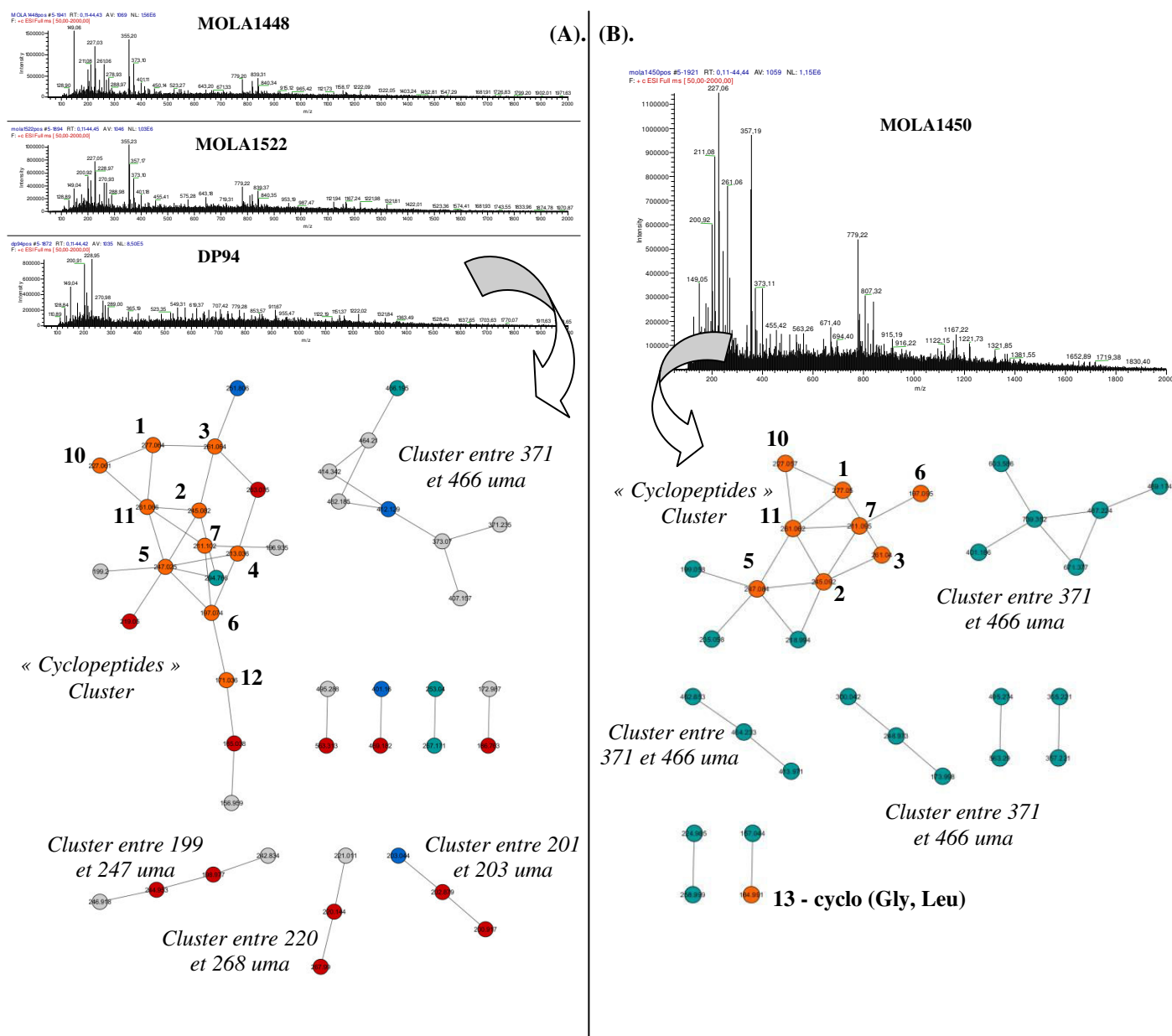
L'analyse du groupe 6 (*Phyllobacteriaceae*, MOLA1416) a mis en évidence la présence de deux clusters de type cyclopeptide (Cluster 1 et Cluster 2) constitués respectivement de 5 et 2 cyclopeptides identifiés. En l'occurrence, les cyclopeptides **6** et **7** constituent le cluster 2 alors que le cluster 1 était constitué des composés **1-3** et **10-11**. D'autre part, à partir de l'étude chimique réalisée de MOLA1416, le métabolite **7** a été isolé confirmant bien sa présence au sein de ces analyses. Cependant, les métabolites **R1** et **R11** isolés lors de l'étude chimique n'ont pas été mis en évidence à travers ces analyses lié à la non ionisation du composé **R1** dans les conditions utilisés et d'une ionisation nettement meilleure du composé **R11** en mode négatif. D'autre part, deux clusters indéterminés principalement ont été mis en évidence au sein de cet extrait AcOEt (cluster entre  $[M+H]^+$   $m/z$  373 et 464 uma et cluster entre  $[M+H]^+$   $m/z$  200 et 389 uma) (**Figure 97**).



**Figure 97 : (A) Spectres de masses ( $[M+H]^+ m/z$ ) de MOLA1416 et (B) représentation cytoscape des interconnexions des spectres de masse de cette souche bactérienne**

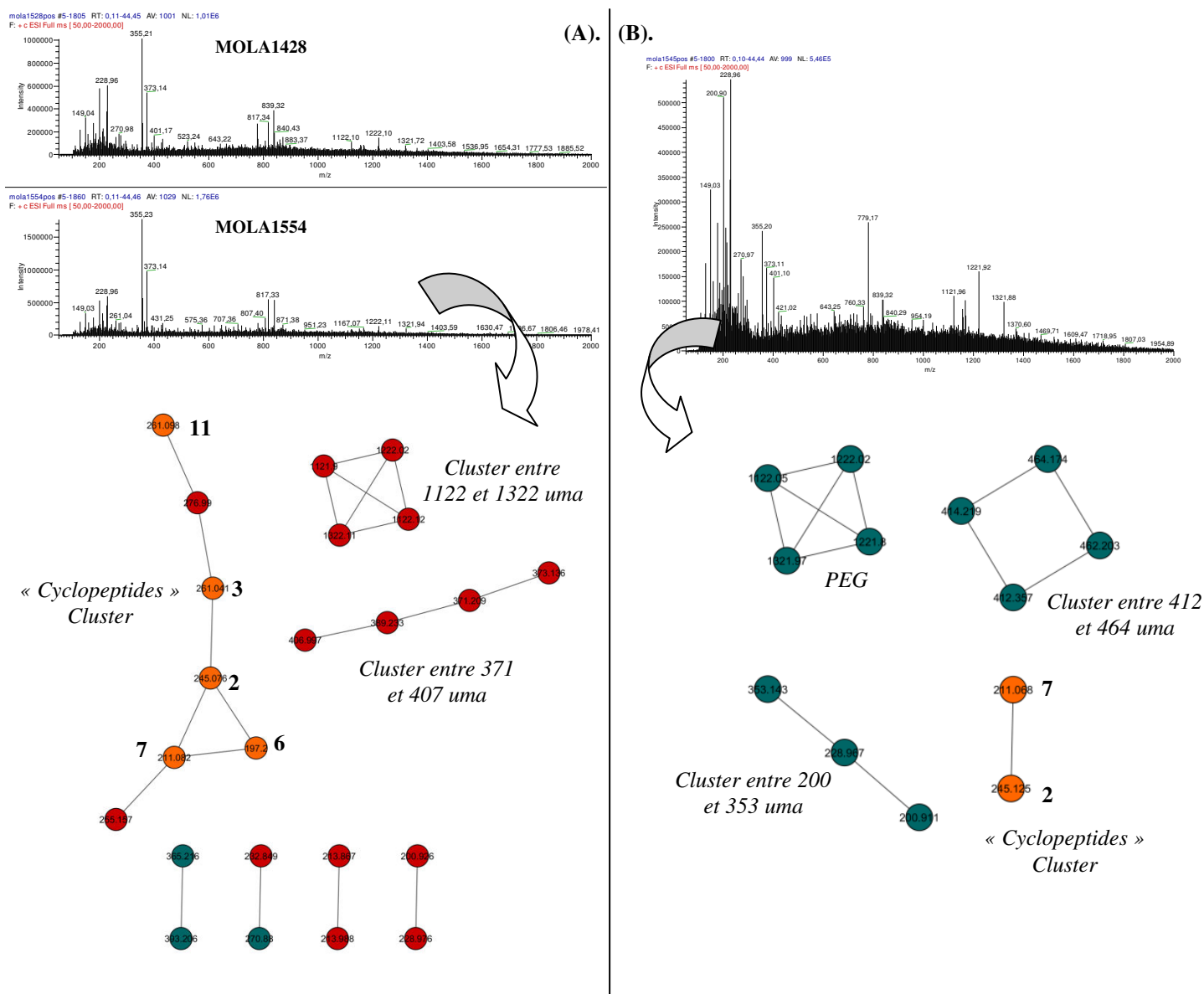
Au sein des *Nocardioideaceae* (DP94) et des *Nocardiaceae* (MOLA1448 et 1522), 10 cyclopeptides ont également pu être identifiés (1 à 7 et 11 à 12) au sein de l'ensemble de ces 3 extraits AcOEt. De plus, à travers ces analyses, quatre clusters indéterminés ont été mis en évidence. En effet, un cluster de  $[M+H]^+ m/z$  compris entre 371 et 466 uma exclusivement présent au sein des extraits de MOLA1448 et MOLA1522 correspondant aux deux *Nocardiaceae*. Les trois autres clusters, plus petits en taille (4-5 métabolites), comprennent des métabolites avec une gamme de masse variant de  $[M+H]^+ m/z$  entre 199 à 247, de 220 à 268 et de 201 à 203 uma. De manière générale, les métabolites mis en évidence appartiennent à des familles chimiques de relativement faible poids moléculaire (Figure 98A).

D'un autre côté, 9 cyclopeptides (1-3, 5-7, 10-11 et 13) ont pu ainsi être identifiés au sein de l'extrait à l'AcOEt de MOLA1450 (*Promicromonosporaceae*). Trois clusters indéterminés ont également été mis en évidence (Figure 98B). De plus, il est à noter la mise en évidence du cyclo-(Gly, Leu) 13 au sein d'un tout petit groupe de métabolites, lui-même associé à un autre composé, susceptible d'être très similaire d'un point de vue structural.



**Figure 98 :** (A) Spectres de masses ( $[M+H]^+$   $m/z$ ) de MOLA1448, MOLA1522 et DP94 (B) Spectres de masses ( $[M+H]^+$   $m/z$ ) de MOLA1450 ainsi que la représentation cytoscape des interconnexions des spectres de masse de ces différentes espèces bactériennes

Enfin, en considérant les deux dernières familles bactériennes étudiées (*Cellulomonadaceae* : MOLA1554 et 1528) et *Micrococcaceae* (MOLA1545)), les analyses ont également permis d'identifier des cyclopeptides. En effet, 5 composés (**2-3**, **6-7** et **11**) ont été identifiés pour les *Cellulomonadaceae* et seulement 2 composés (**2** et **7**) pour la souche *Micrococcaceae*. De plus, les 5 métabolites identifiés ont été mis en évidence au sein de ces deux souches bactériennes appartenant à la famille des *Cellulomonadaceae* (Figure 99).



**Figure 99 :** (A) Spectres de masses ( $[M+H]^+$   $m/z$ ) de MOLA1528 et MOLA1554 (B) Spectres de masses ( $[M+H]^+$   $m/z$ ) de MOLA1545 ainsi que la représentation cytoscape des interconnexions des spectres de masse de ces différentes espèces bactériennes

En conclusion, cette étude de déréplication via la plateforme GnPs et la visualisation des données à l'aide du logiciel Cytoscape a permis (1) de mettre en évidence l'ubiquité du composé **2** (cyclo-(L-Phe, D-Pro)) et (2) la présence des composés **3**, **6** et **7** de manière non négligeable au sein de ces 10 extraits bactériens (présence dans 5/6 des groupes définis). D'un autre côté, ces analyses ont mis en évidence la présence spécifique (1) du composé **12** au sein des *Nocardioideaceae* et des *Nocardiaceae* et (2) du composé **13** au sein des *Promicromonosporaceae*.

Ainsi, de manière générale, un cluster de molécules de types dicétopiperazines a été mis en évidence et identifié au sein de ces extraits. Ces dicétopiperazines se sont révélées être ubiquitaires au sein de ces dix extraits et donc non suffisamment discriminant au cours d'un profilage chimique. De

plus, des clusters non identifiés, potentiellement intéressants d'un point de vue chimique, ont également été mis en évidence.

Parmi ces métabolites spécifiques identifiés, certains d'entre eux ont montré des propriétés antibactériennes (**2**, **3**, **7** et **10**). Ainsi le cyclo (L-Phe, L-Pro) (composé **2**) et le cyclo (L-Leu, L-Pro) (composé **7**) ont montré une CMI entre 0.25-1 µg/mL vis-à-vis d'*Enterococcus* (plus actifs sur *E. coli*), de *S. aureus* et de *Micrococcus luteus*.<sup>125</sup> Ainsi, la présence de tels composés pourraient en partie expliquer les propriétés antibactériennes de l'extrait à l'AcOEt de MOLA1488 observées, s'ajoutant à cela les propriétés multiples déjà décrites des actinomycines (antibactériennes, cytotoxiques ...).<sup>128</sup>

D'un autre côté, les propriétés cytotoxiques des extraits non étudiés par étude chimique peuvent être dues à la présence des composés (**2** et **7**) ayant montré des propriétés cytotoxiques au cours de notre étude. D'autres composés présents entre autre dans l'extrait de MOLA1528 présentent des propriétés cytotoxiques mais avec une CI<sub>50</sub> (extrait AcOEt MOLA1528) restant à préciser.

Ainsi, les souches bactériennes considérées possèdent un ou des métabolites d'intérêts en plus des métabolites mis en évidence par déréplication. Cependant, l'efficacité de cette déréplication repose sur les conditions d'ionisation et de fragmentation des composés présents dans les extraits analysés, des paramètres utilisés, en l'occurrence le delta de masse considéré (ici, il a été fixé à 1 Da, vis-à-vis du système de masse utilisé) et des bases de données disponibles (GnPs contient 1640 métabolites). Malgré ces points non négligeables, cette approche de déréplication au cours des étapes d'études chimiques aurait peut-être permis de mettre en évidence des composés connus et donc faciliter une focalisation sur des métabolites potentiellement nouveaux. Ceci n'a pas pu être mis en place du fait de deux points majeurs et importants : absence de LC-ESI-MS/MS au laboratoire et mise à disposition de la plateforme GnPs (encore non officielle) depuis courant mars 2014.

### 3. Conclusion et perspectives de l'étude bactériochimique

Au travers de cette étude bactériochimique, de nombreuses souches bactériennes cultivables (247 souches bactériennes) ont été isolées de quatre lichens marins/maritimes (*Lichina confinis*, *L. pygmaea*, *Roccella fuciformis*) et terrestre (*Collema auriforme*).

Les lichens sont donc une source bactérienne non négligeable et cette diversité, dépendante des conditions de culture, semblerait être plus similaire entre des lichens soumis à un même environnement. Du fait de la présence de quelques souches bactériennes connues pour être productrices de métabolites d'intérêts (*Streptomyetaceae*, *Nocardioidaceae*, *Pseudonocardioidaceae*, *Promicromonosporaceae* par exemple), il en résulte que les lichens sont donc également une source potentielle de souches bactériennes à forts potentiels biologiques. Ceci a été également mis en évidence au cours d'un criblage biologique (génétique : PKS et antibactérien). En effet, 8 familles d'*Actinobacteria* (*Microbacteriaceae*, *Micrococcaceae*, *Streptomyetaceae*, *Mycobacteriaceae*,

*Cellulomonadaceae*, *Nocardioideaceae*, *Brevibacteriaceae* et, *Pseudonocardioideaceae*) se sont révélées être PKS I et/ou PKS II positifs. De plus, 12.6% des souches bactériennes cultivables totales présentent un potentiel de production de métabolites d'intérêts (antibactériens et/ou cytotoxiques) non négligeables.

D'un autre côté, l'étude chimique de deux souches bactériennes associées soit à *Lichina confinis* (MOLA1488) soit à *Lichina pygmaea* (MOLA1416) ont permis d'isoler et d'identifier divers métabolites. En effet, à partir de deux cultures liquides de la souche MOLA1488, neuf métabolites différents ont été isolés. Parmi ces neuf composés, six ont été identifiés structurellement (2 dicétopipérazines : **D7** et **D8** ; un indole (**D2**), un dérivé de la tryptamine (**D10**) ainsi que la *N*-Me-dactinomycine (**D9**) et trois sont en cours d'identification. A l'heure actuelle, un nouveau métabolite (**D12**) a été isolé à partir de cette souche bactérienne. L'ensemble des métabolites identifiés et testés (exception du composé **D12**) ont montré des propriétés cytotoxiques importantes et certaines d'entre elles spécifiques d'une lignée cellulaire (**D7**). A partir de la souche MOLA1416, six métabolites différents ont été isolés. Parmi ces six composés, trois ont été identifiés structurellement (une prodigiosine (**R1**), une dicétopipérazine (**R2**) et un diester aromatique (**R11**)) et trois sont en cours d'identification. A l'heure actuelle, il est à noter que pour la première fois, une source naturelle nouvelle du métabolite **R11** a été mise en évidence : *Hoeflea phototrophica* (MOLA1416).

De plus, l'étude de déréplication par LC-ESI-MS/MS mis en place sur 10 extraits bactériens a permis de mettre en évidence la présence ubiquitaire de dicétopipérazines ainsi que l'utilisation d'une méthode intéressante, basée sur les similarités de fragmentation des composés, dans l'identification des composés présents dans divers extraits que ce soit des extraits bactériens, lichéniques ou de plantes.

En conclusion, de nombreuses souches bactériennes ont été isolées et identifiées. Des études chimiques et structurales de certains des composés isolés sont actuellement en cours d'identification. et du fait du manque de quantité, certains n'ont pas pu du tout être identifiés. De plus, le manque de quantité n'a pas permis de déterminer les structures et les configurations absolues de l'ensemble des composés isolés.

Ainsi, il serait intéressant de poursuivre l'étude de ces souches bactériennes dont certaines montrent des propriétés biologiques intéressantes en utilisant systématiquement une méthode de déréplication couplée à un criblage biologique pour faciliter l'identification de nouveaux métabolites bioactifs potentiels.





*PARTIE 3 - Extraits  
lichéniques/bactéries associées.*

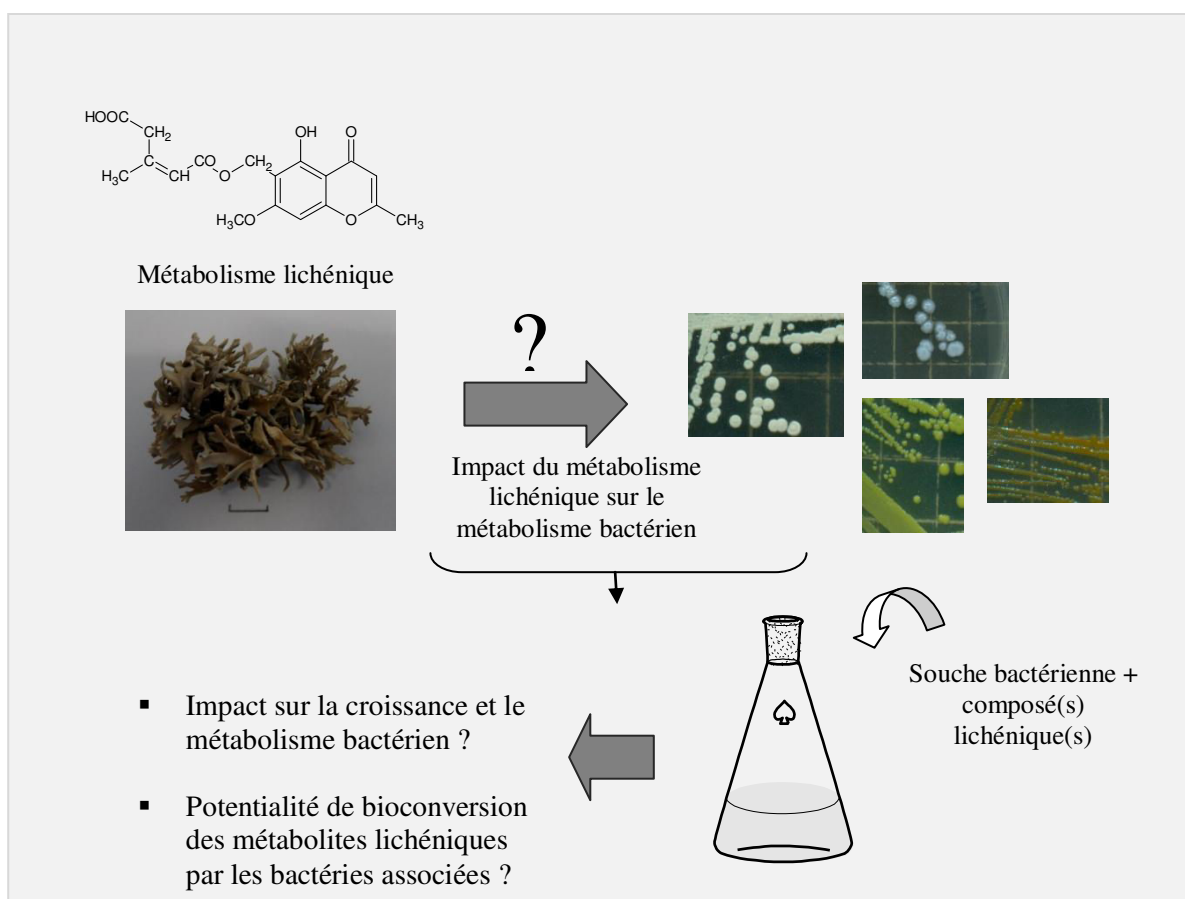
---



## 1. Objectifs de l'étude de l'influence d'extraits lichéniques sur le métabolisme des bactéries associées

Suite à l'étude chimique réalisée entre autre sur *R. fuciformis* et à la diversité des bactéries cultivables associées mise en évidence, une approche de cultures bactériennes associées à des métabolites lichéniques a été mise en place. Ce travail a été réalisé en partie en Autriche grâce à l'obtention d'un financement PHC Amadeus (29293QK, S. Tomasi).

Dans une perspective de mettre en évidence des interactions possibles entre les lichens et les communautés bactériennes associées, un cas d'étude a été choisi et mis en place sur *Roccella fuciformis* : quelles sont les influences du métabolisme lichénique sur la croissance et sur le métabolisme de ces communautés bactériennes associées ? Est-ce que ces bactéries associées ont la capacité d'utiliser/de transformer les métabolites lichéniques ? (**Figure 100**).



**Figure 100 : Schéma général de la partie 3- Extraits lichéniques/bactéries associées**

Pour cela, quatre bactéries cultivables majoritairement associées à *Roccella fuciformis* (MOLA 1554 (*Paraoerskovia* sp.), MOLA 1545 (*Microbacterium* sp.), MOLA 1522 (*Nocardioide* sp.) et MOLA 1528 (*Paraoerskovia* sp.)) et quatre métabolites majoritaires de ce lichen (l'érythritol, l'acide lépranique, l'érythrine et l'acétylportentol) ont été choisis pour cette étude. Premièrement, après l'optimisation d'une méthode de détermination de la viabilité de cellules bactériennes, l'impact des métabolites lichéniques sur la croissance bactérienne et leur métabolisme a été étudié. Deuxièmement,

la capacité de bioconversion de deux composés (érythrine et acide lépranique) de *R. fuciformis* par ces quatre bactéries associées a été évaluée.

## 2. Résultats

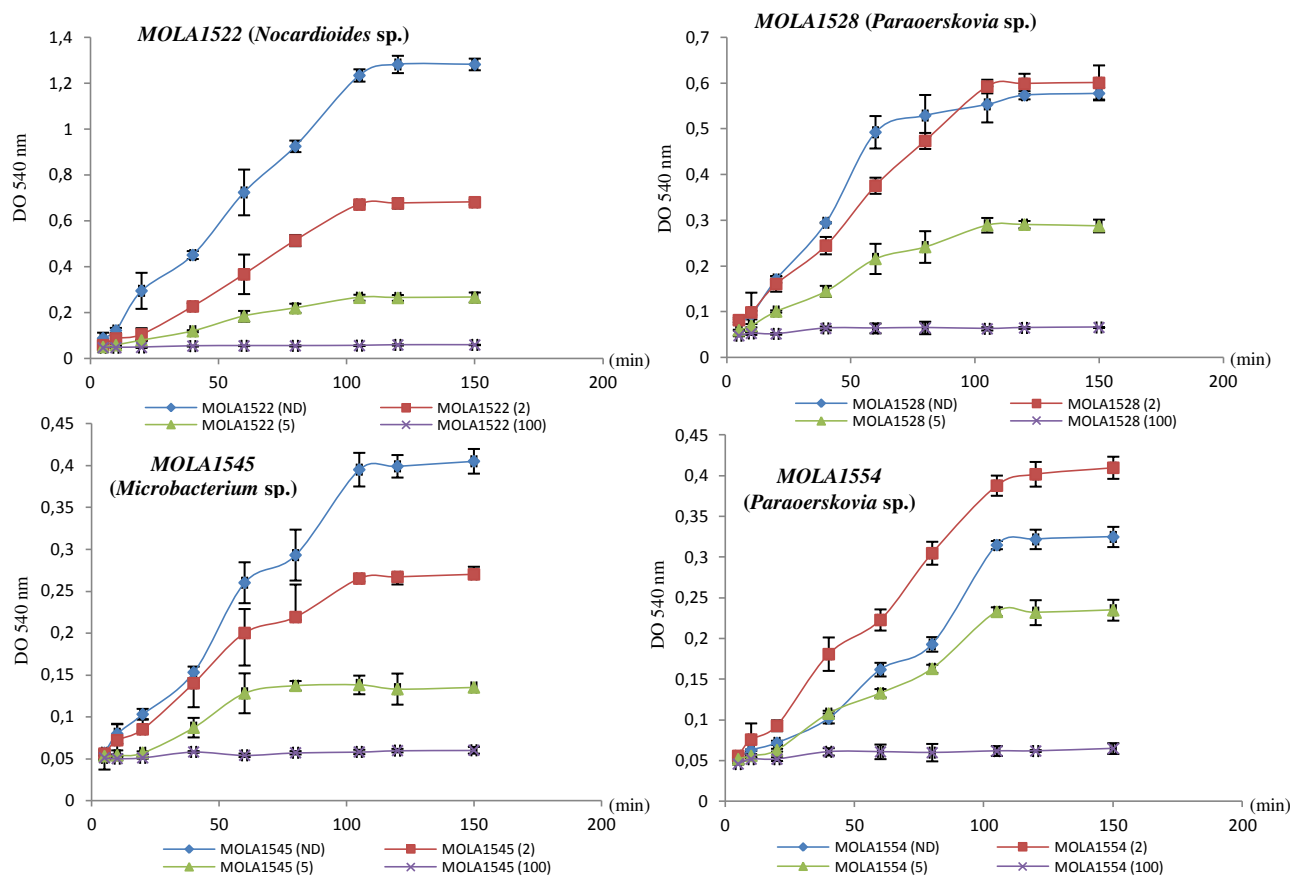
### 2.1.1. Impact des métabolites lichéniques sur la croissance et le métabolisme bactérien

#### 2.1.1.1. Optimisation d'une méthode d'évaluation de la viabilité bactérienne par le bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT)

Dans un premier temps, une optimisation d'une méthode de viabilité bactérienne a été réalisée.<sup>135</sup> Ceci a consisté à mettre au point leur méthode en microplaque et sur des micro-organismes environnementaux de coloration Gram positive. Pour cela, les souches bactériennes ont été mises en culture (Marine Broth (MB)) durant 5 jours à 25 °C sous 110 rpm. Quatre conditions ont été choisies : cultures non diluées (ND), dilution au 1/2 (2), dilution au 1/5 (5) et également une dilution au 1/100 (100) afin d'obtenir une gamme d'absorbance avec potentiellement une DO maximale à 620 nm autour de 0.2 mAU pour un maintien de la linéarité lors de la lecture de la DO à 540 nm après ajout du MTT et reprise par du DMSO. Tout d'abord, le temps nécessaire de réduction du MTT a été déterminé. Des temps d'incubation à 37 °C en présence de 100 µL de culture et de 10 µL de MTT à 5 mg/mL variant de 5 min à 2h30 ont été testés. Après incubation, élimination du surnageant et du MTT et incubation 15 min dans le DMSO température ambiante<sup>135</sup>, les microplaques ont été lues au spectrophotomètre à 540 nm. Les mesures ont été réalisées en triplicata et les graphiques ci-dessous (**Figure 101**) ont été réalisés. Il en résulte que le temps d'incubation minimal nécessaire pour la réduction du MTT par les bactéries viables, quelque soient la dilution effectuée et la souche bactérienne était de 1h45. En effet, de 5 min à 1h45, il a été observé une augmentation de la densité optique à 540 nm alors qu'à partir de 1h45 jusqu'à 2h, la densité optique mesurée était stable signifiant la réduction totale du MTT par ces bactéries au bout de 1h45 d'incubation.

Par conséquent, le temps de réduction du MTT est plus long pour des bactéries de coloration Gram positive (1h45 pour des *Actinobacteria*) que pour des bactéries de coloration Gram négative (20 min pour *E. coli*).<sup>135</sup> Cela peut s'expliquer par la composition différente de la paroi bactérienne de ces deux grands types de bactéries. En effet, les bactéries de coloration Gram positive présentent une couche peptidoglycane plus importante que celle des bactéries de coloration Gram négative pouvant impliquer une pénétration plus difficile du MTT et par conséquent un temps de réduction de ce dernier plus long. Ainsi, le temps nécessaire de réduction du MTT et donc la détermination de la viabilité d'un échantillon est (1) dépendant du type de bactéries en présence (bactéries de coloration Gram positive ou de coloration Gram négative) et également (2) de la souche bactérienne elle-même.

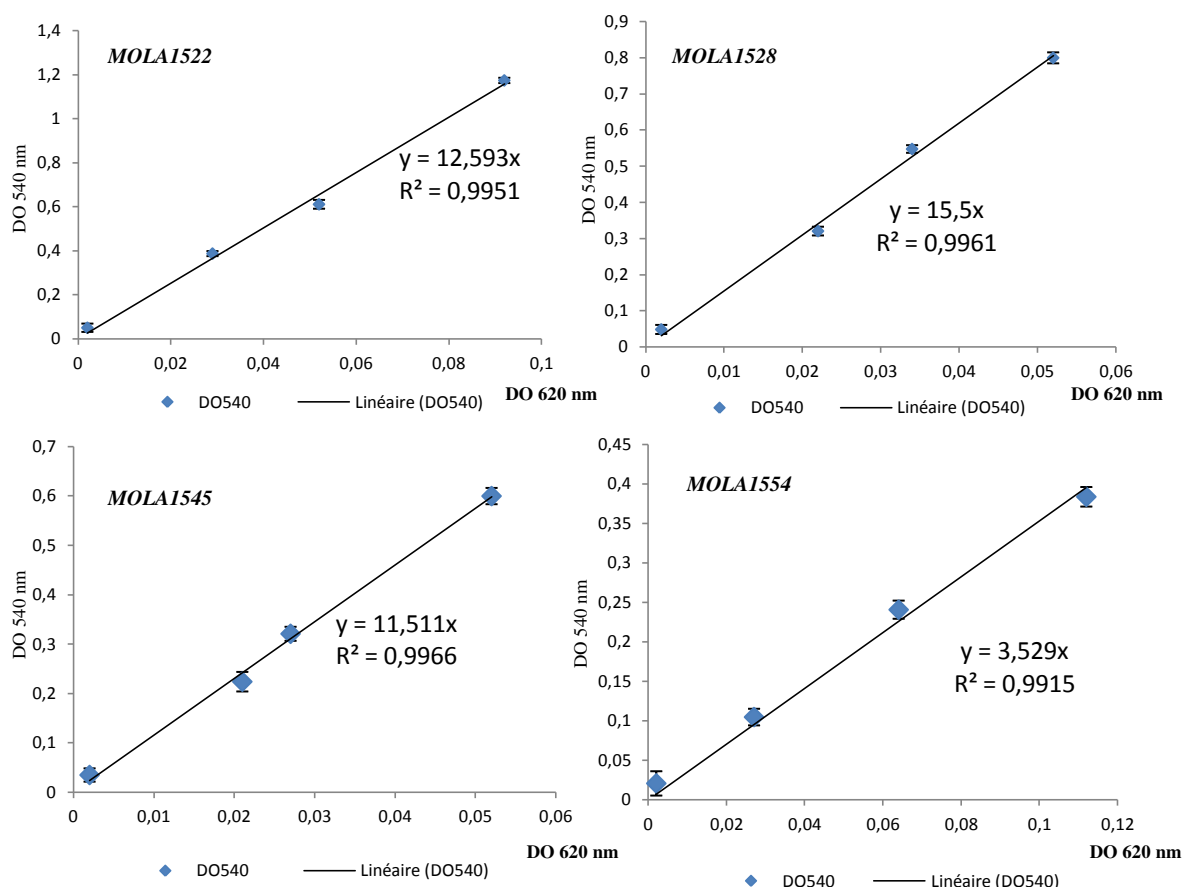
<sup>135</sup>Wang, H., Cheng, H., Wang, F., Wei, D., Wang, X. (2010) *Journal of Microbiology Methods*. 82, 330–333.



**Figure 101 : Profils des courbes de réduction du MTT des cultures des quatre souches bactériennes selon leur facteur de dilution (non diluées (ND), dilution au 1/2 (2), au 1/5 (5) et dilution au 1/100 (100))**

Afin de vérifier la linéarité de réduction du MTT, les cultures bactériennes ont été à nouveau préparées (non diluée, dilution au 1/2, au 1/5 et dilution au 1/100). L'absorbance à 620 nm de 100  $\mu$ L de chacune des conditions de culture a été mesurée. 10  $\mu$ L de MTT y ont été ajoutés et une incubation à 37 °C pendant 1h45 a été réalisée. Après l'élimination de la culture et du MTT et l'ajout de de DMSO (200  $\mu$ L), les microplaques ont été incubées à température ambiante pendant 15 min avant d'effectuer une mesure de densité optique à 540 nm. Les droites d'étalonnage pour chaque souche bactérienne ont été réalisées et les coefficients de régression ( $R^2$ ) ont été déterminés (**Figure 102**). Les analyses ont été réalisées en triplicata.

Ainsi, pour l'ensemble de ces quatre souches bactériennes, la linéarité de réduction du MTT était maintenue avec des coefficients de régression de 0,99. Par conséquent, la méthode de détermination de la viabilité de ces cultures bactériennes en microplaques par le MTT peut être appliquée à l'ensemble des conditions à tester, c'est-à-dire en présence des métabolites lichéniques de *R. fuciformis* (l'érythrine, l'acide léprarique, l'acétylportentol et le méso-érythritol).



**Figure 102 : Droites d'étalonnages de réduction du MTT pour chacune des quatre souches bactériennes**

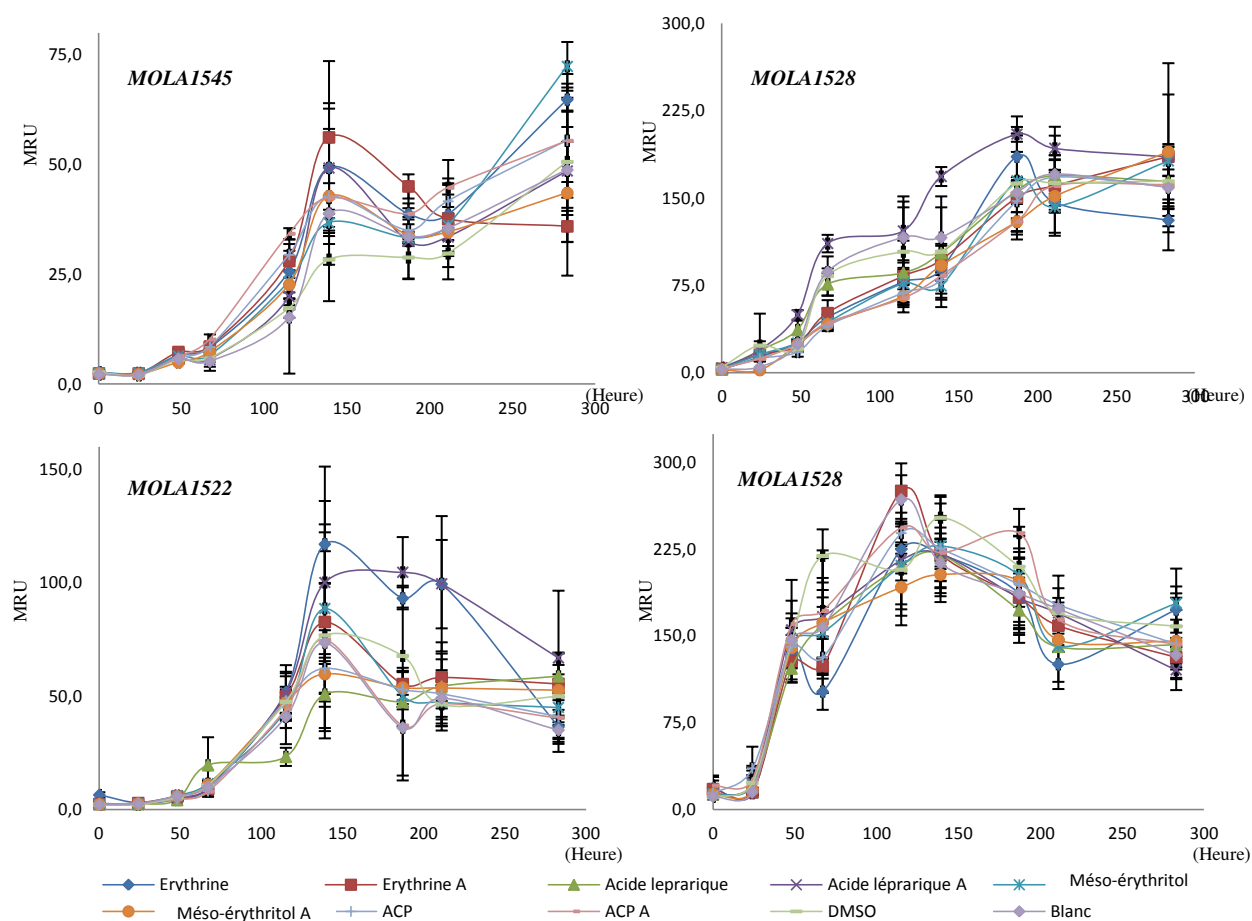
### 2.1.1.2. Impact sur la croissance bactérienne : Résultats

Suite à l'optimisation de la méthode de détermination de la viabilité de culture bactérienne par le MTT, l'impact du métabolisme lichénique sur la croissance bactérienne a été évalué. Pour chaque culture (50 mL ; 110 rpm ; 25°C) réalisée en duplicata, 30 µL d'érythrine, d'acide lépranique, d'acétylportentol ou de méso-érythritol solubilisés dans le DMSO ont été ajoutés dans les cultures. Afin de vérifier la croissance bactérienne et de déterminer l'impact de chacun de ces métabolites sur la croissance bactérienne, les cultures bactériennes seules (contrôle) et en présence de 30 µL de DMSO (DMSO) ont également été testées (témoins négatifs). Les cultures étaient incubées à 25 °C sous 110 rpm et le suivi de la densité optique à 620 nm et à 540 nm (après incubation avec le MTT à 37 °C pendant 1h45) était mesuré quotidiennement durant 12 jours. La réduction du MTT par les cultures bactériennes par DO 620 nm et par mL (MRU) a été calculé à partir de la formule suivante décrite<sup>135</sup> :

$$MRU = DO_{540} \times (200 \mu L / 110 \mu L) \times (1000 \mu L / 100 \mu L) \times K / DO_{620}$$

avec K = facteur de dilution des échantillons permettant d'avoir une DO à 620 nm inférieure ou égale à 0.2 mAu, 200 µL correspondant au volume de DMSO, 100 µL au volume de la culture bactérienne et 10 µL au volume de MTT à 5 mg/mL

Les courbes de croissance reflétant la viabilité de l'échantillon ont été réalisées (**Figure 103**).



**Figure 103 : Courbes de croissance des quatre souches bactériennes en présence ou non d'un composé lichénique**

*Légende : le A correspond au duplicata ; ACP : acétylportentol*

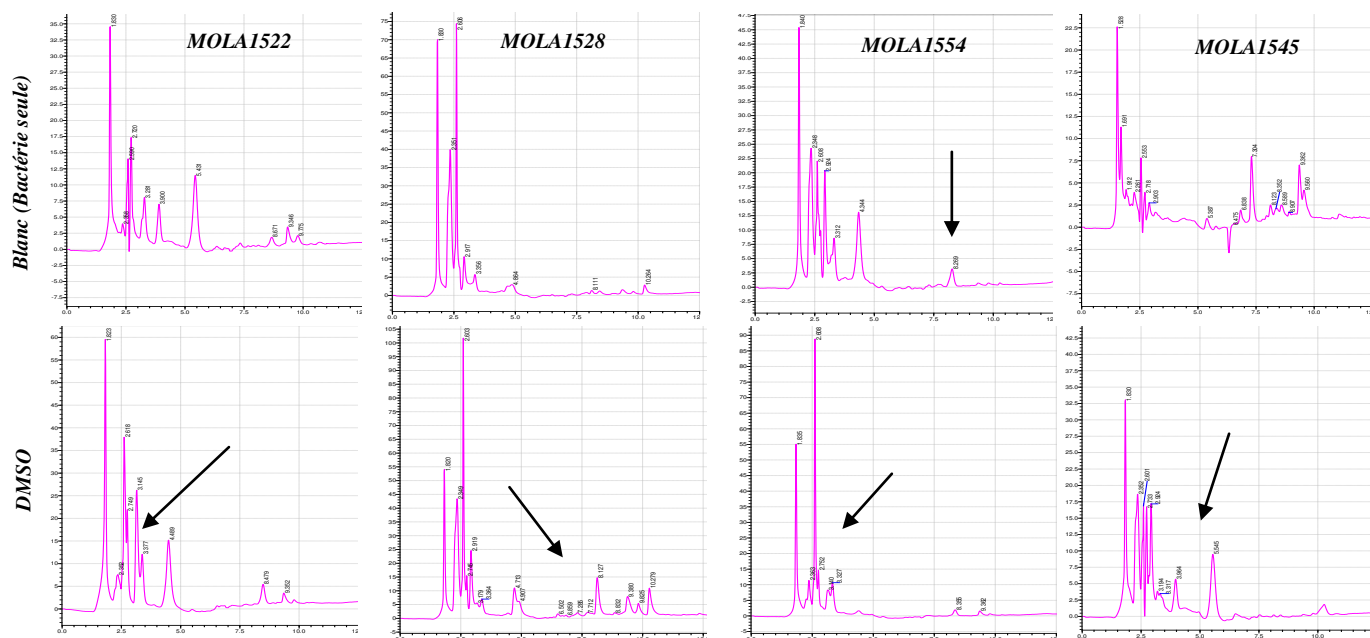
Ainsi, ces courbes de croissance ont permis de mettre en évidence que les composés majoritaires de *R. fuciformis* seuls n'influençaient pas la croissance bactérienne de chacune de ces quatre bactéries. En effet, quelque soit le métabolite considéré, la courbe de croissance était similaire aux courbes de croissance témoins (Blanc et DMSO). Ainsi, la croissance bactérienne de ces quatre souches n'était pas modifiée par l'un de ces métabolites lichéniques mais qu'en est-il de leur métabolisme ?

### 2.1.1.3. Impact sur le métabolisme bactérien : Résultats

Suite à l'étude de la croissance bactérienne en présence ou non de composés lichéniques et à leur non influence sur la croissance bactérienne de ces quatre souches, chacune des cultures a été extraite par de l'AcOEt (2 fois successivement). Les extraits à l'AcOEt ainsi obtenus ont été analysés par CLHP à 280 nm (longueur d'onde permettant de visualiser le plus de métabolites dans ces extraits).

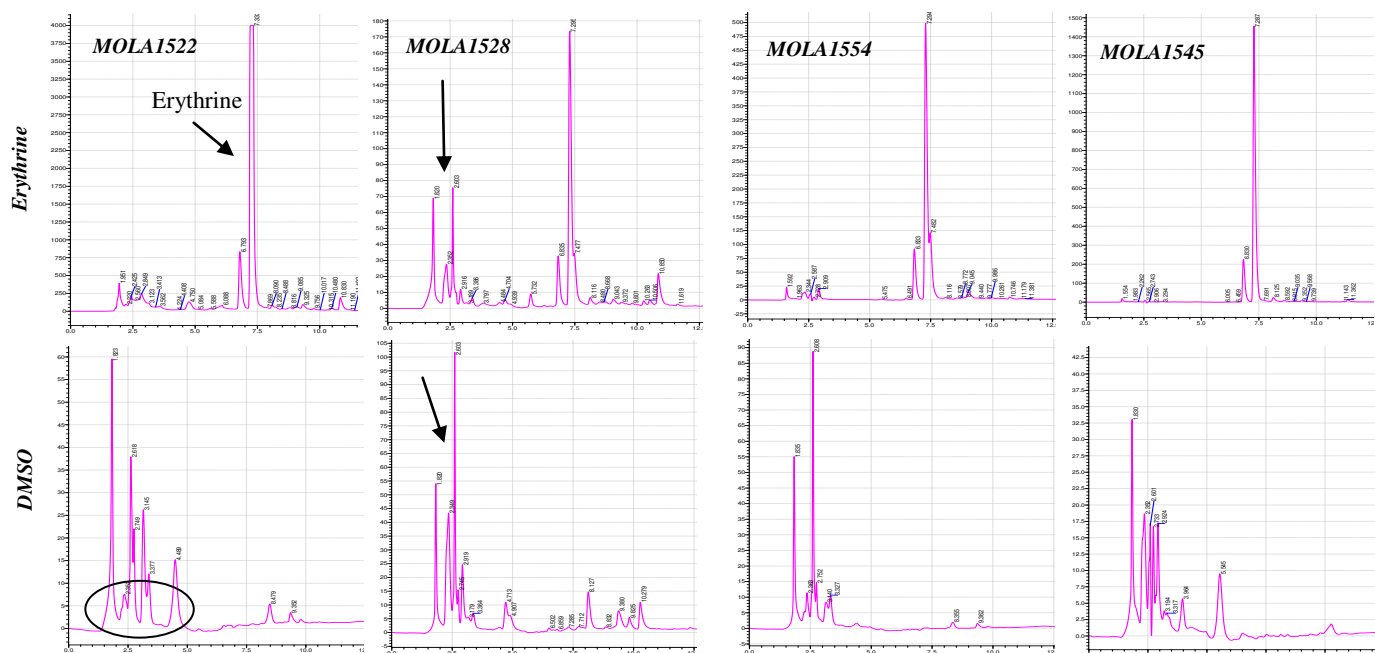
De manière générale, quelque soit la souche bactérienne, il a été constaté que l'ajout de 30  $\mu$ L de DMSO modifiait le métabolisme bactérien. En effet, les profils chimiques des bactéries étaient modifiés soit par l'ajout ou la suppression de production de certains métabolites (flèches) (Figure 104).





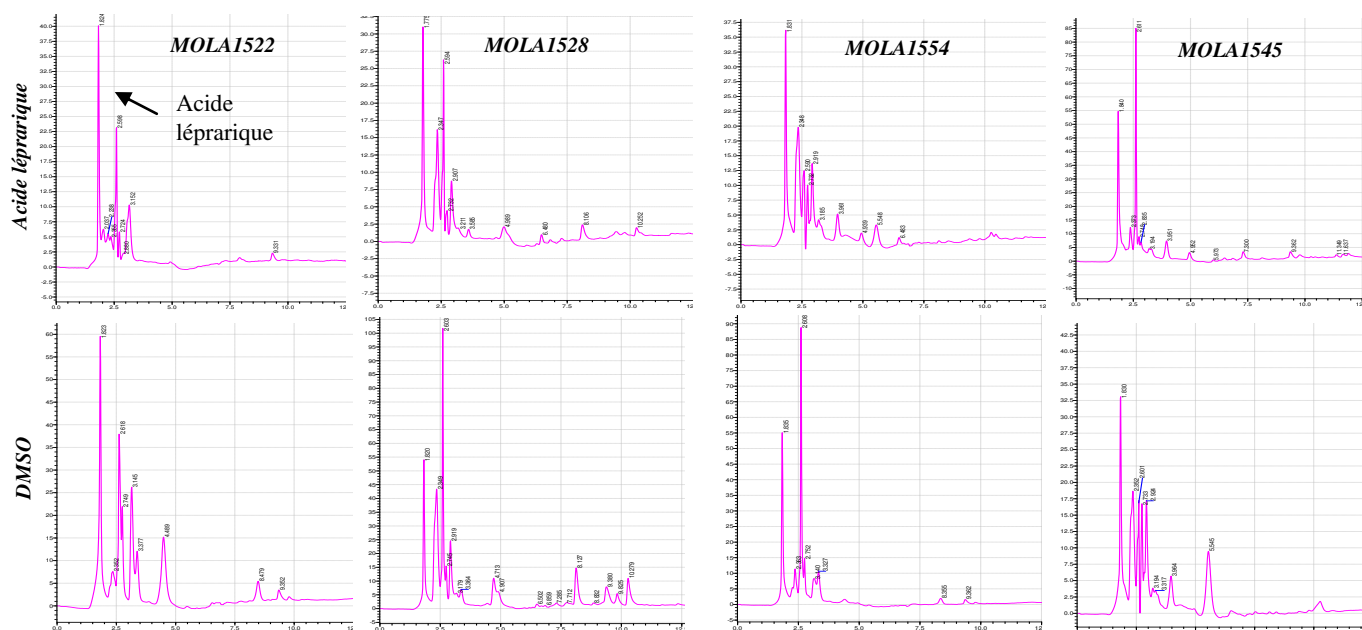
**Figure 104 :** Extraits de chromatogramme (0 à 12 min) à 280 nm des extraits à l'AcOEt des 4 souches bactériennes en absence de composés lichéniques  
(Blanc : bactérie seule et DMSO : solvant de solubilisation des composés)

En ce qui concerne l'érythrine, le métabolisme bactérien était fortement impacté par ce métabolite. En effet, la présence d'érythrine était visualisée sur les chromatogrammes mais surtout les métabolites éluant entre 0 et 5 min étaient fortement impactés. Ces derniers étaient soit diminués en nombre, soit diminués en intensité (lié probablement à la dominance de l'érythrine) ou soit également modulés par la production d'autres métabolites (MOLA1528) (**Figure 105**).



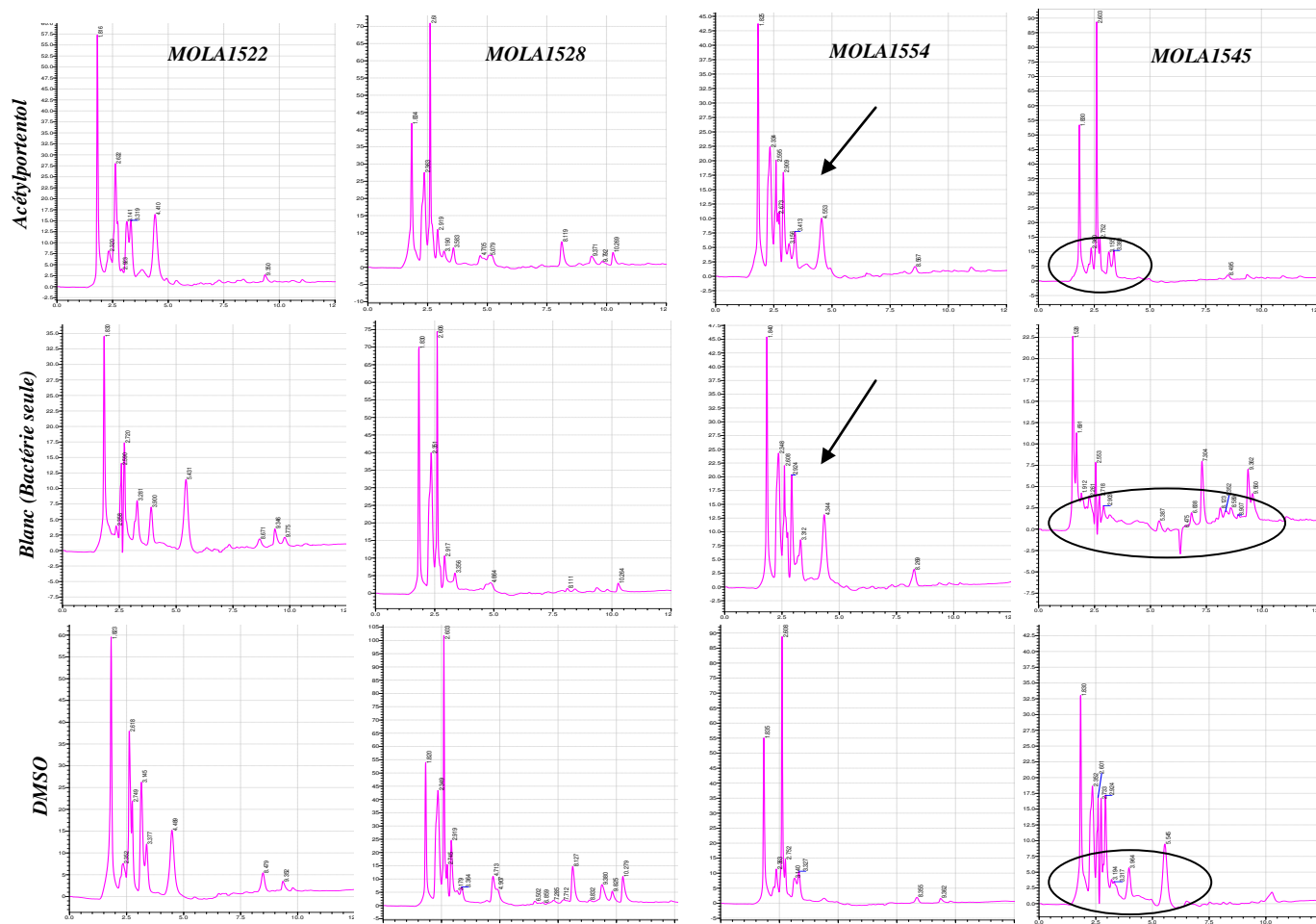
**Figure 105 :** Extraits de chromatogramme (0 à 12 min) à 280 nm des extraits à l'AcOEt des 4 souches bactériennes en présence d'érythrine  
(DMSO : solvant de solubilisation des composés)

Les mêmes observations ont été mises en évidence pour l'ajout de l'acide léprarique. En effet, les métabolites situés entre 0 et 5 min étaient également les plus impactés (**Figure 106**).



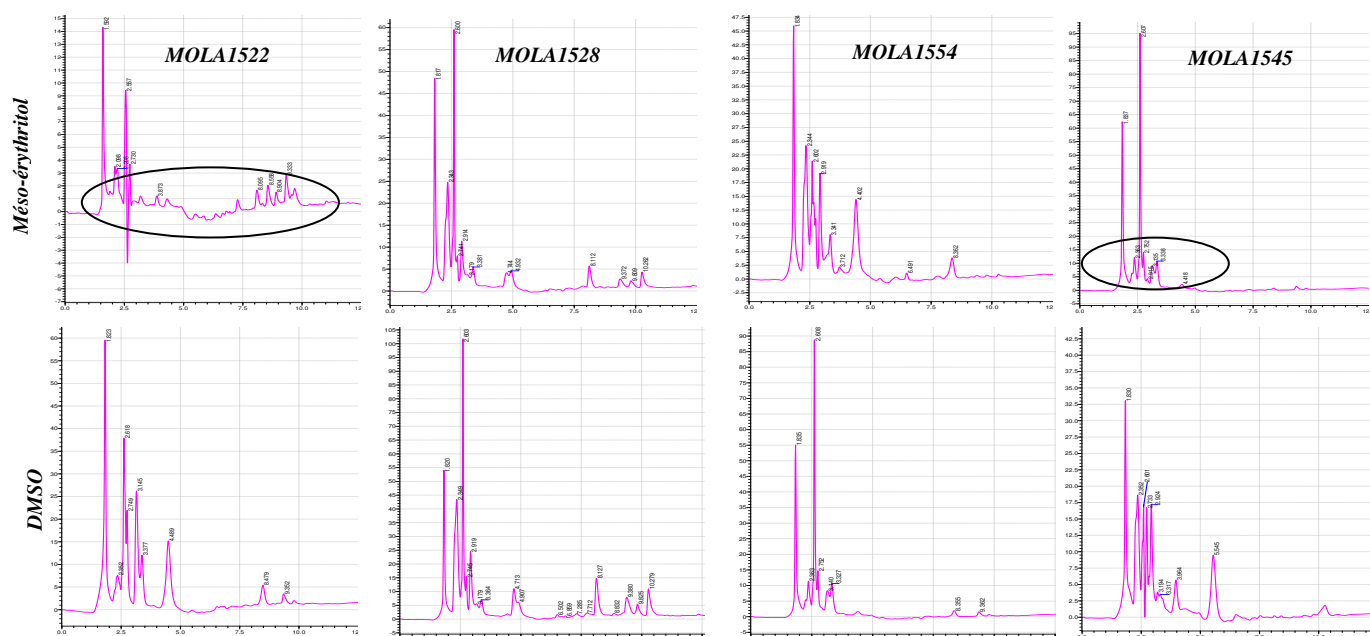
**Figure 106 : Extraits de chromatogramme (0 à 12 min) à 280 nm des extraits à l'AcOEt des 4 souches bactériennes en présence d'acide léprarique (DMSO : solvant de solubilisation des composés)**

En ce qui concerne l'acétylportentol, les souches MOLA1522 et 1528 ont montré un profil identique à celui du témoin DMSO alors que pour la souche MOLA1554, son profil chimique était plus similaire au témoin contrôle (flèches). Pour MOLA1554, le profil chimique a été modifié et été complètement différent de celui en présence de DMSO ou de celui de la souche bactérienne seule. Cependant, son profil chimique semble être plus semblable de celui modifié en présence d'acide léprarique (**Figure 107**).



**Figure 107 :** Extraits de chromatogramme (0 à 12 min) à 280 nm des extraits à l'AcOEt des 4 souches bactériennes en présence d'acétylportentol  
(Blanc : bactérie seule et DMSO : solvant de solubilisation des composés)

Enfin, le méso-érythritol, un métabolite primaire non aromatique et une source de carbone potentielle, influençait le métabolisme de MOLA 1522 et MOLA1545 alors qu'il n'avait aucun effet sur le métabolisme de MOLA1528 (profil identique au témoin DMSO). Pour MOLA1554, le profil chimique était identique au témoin Blanc (**Figure 108**).



**Figure 108 : Extraits de chromatogramme (0 à 12 min) à 280 nm des extraits à l'AcOEt des 4 souches bactériennes en présence de méso-érythritol (DMSO : solvant de solubilisation des composés)**

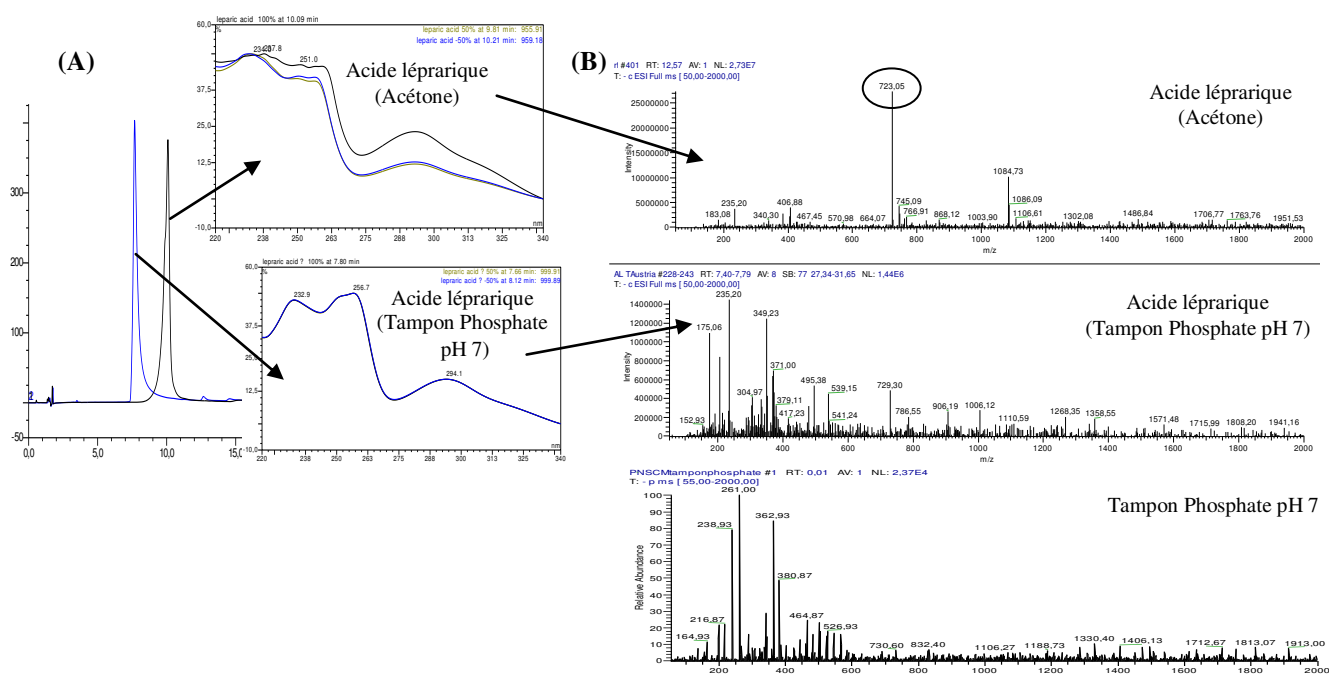
Suite à ces résultats, on pourrait émettre l'hypothèse que l'acétylportentol et le méso-érythritol (pour certaines souches : MOLA1545 pour l'acétylportentol et MOLA1554 pour l'acétylportentol et le méso-érythritol) permettraient de contrer l'impact du DMSO sur le métabolisme et rétablir leur propre métabolisme. Mais pour confirmer cela, des études complémentaires plus sensibles devraient être réalisées : profilage par LC/MS par exemple. En conclusion, ces quatre composés lichéniques n'ont pas influencé de manière significative la croissance bactérienne de ces quatre bactéries. Par contre, leur métabolisme était influencé par ces métabolites de manière différente selon la souche bactérienne considérée et cela même pour deux espèces du même genre : MOLA1528 et MOLA1554 (*Paraoskovia* sp.).

### 2.1.2. Potentialité de bioconversion des bactéries associées

Par la suite, une étude de bioconversion de ces quatre souches bactériennes vis-à-vis de deux métabolites secondaires aromatiques (pour un suivi par des analyses de type chromatographiques : CLHP et LC/MS) de *Rocella fuciformis* : érythrine et acide léprarique a été réalisée en Autriche (acide léprarique) et à Rennes (érythrine). Les souches ont été mises en culture dans 30 mL de milieu MB à 25 °C sous 110 rpm pendant 7 jours. À la fin de cette période, les cultures ont été centrifugées (4 °C, 4000 G, pendant 20 min), les surnageants ont été éliminés et remplacés par 30 mL d'une solution de Tampon Phosphate à pH7 stérilisée et remises à incuber (25 °C, 110 rpm). À temps régulier (J1, J4, J8, J11 et J15), les cultures (en duplicata pour chaque temps d'incubation) ont été extraites deux fois successivement par de l'AcOEt (v/v). Les extraits ainsi obtenus ont été analysés par CLHP et également par LC/MS pour ceux ayant montré des modifications du profil chimique.

### 2.1.2.1. Cas de l'acide léprarique (Autriche, PHC Amadeus)

Suite aux profilages chimiques par CLHP (dans un premier temps) de l'ensemble des extraits obtenus, il a été mis en évidence tout d'abord que l'acide léprarique ne semblait pas stable dans la solution de Tampon Phosphate à pH7. Le temps de rétention du pic majoritaire passait de 10 min (acide léprarique dans de l'acétone) à 8 min (acide léprarique extrait après incubation dans la solution Tampon Phosphate pH 7) (**Figure 109A**). Mais, les profils UV de ces deux produits étaient identiques. Afin de vérifier la possibilité d'une dégradation de l'acide léprarique par le Tampon Phosphate pH 7, l'extrait a été analysé par LC/MS (Plateforme P2M2, Inra, Le Rheu, France). Ainsi, il a été mis en évidence la non présence de l'acide léprarique natif dans l'extrait mais de produits de dégradation non identifiés de ce dernier (**Figure 109B**).



**Figure 109 : Profils HPLC et UV de l'acide léprarique (tampon phosphate pH7 et acétone) à 280 nm (A) et spectres de masses en mode négatif ( $[M-H]^-$  m/z) de ces deux mêmes extraits et du tampon phosphate pH7 (B)**

En ce qui concerne l'ensemble des extraits bactériens, l'acide léprarique ou plus précisément ces produits de dégradation n'ont pas été bio-convertis par ces quatre souches au bout de 15 jours (**Figure 110**). En effet, le profil chimique était le même que celui observé pour l'acide léprarique seul au sein du tampon phosphate pH7.

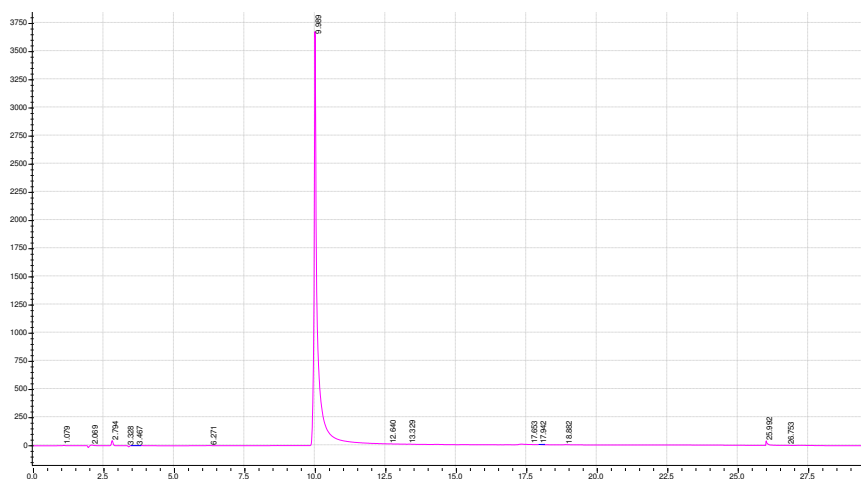


Figure 110 : Chromatogramme à 280 nm de l'extrait AcOEt de MOLA1545 J15

Par conséquent, à travers cette étude, on n'a pas pu mettre en évidence la bioconversion possible de l'acide léprarique par ces quatre souches dû notamment à une instabilité du composé dans la solution Tampon Phosphate pH7. Malgré cela, les produits de dégradation de l'acide léprarique n'ont pas non plus été bio-convertis par ces souches bactériennes.

#### 2.1.2.2. Cas du (+)-érythrine (Rennes)

De même que pour l'acide léprarique, l'étude de bioconversion potentielle de l'érythrine par ces quatre *Actinobacteria* a été réalisée. L'érythrine pure (solubilisation dans l'acétone) ainsi que l'érythrine incubée dans le Tampon Phosphate pH7 ont également été analysées. Comme précédemment, la solution Tampon Phosphate pH7 a dégradé l'érythrine. D'après les spectres de masse ( $[M-H]^-$   $m/z$ ), la dégradation de l'érythrine a donné 2 composés majoritairement de  $m/z$  271 et 167. D'après l'étude chimique de *R. fuciformis* (cf. PARTIE 2), ces deux composés correspondaient au montagnétol ( $[M-H]^-$   $m/z$  271) et l'acide orsellinique ( $[M-H]^-$   $m/z$  167) (Figure 111). De manière générale, les quatre souches bactériennes étudiées ont été capables de bioconvertir l'érythrine et ces deux produits de dégradation majoritaires. Cependant, le temps nécessaire de bioconversion était différent selon la souche considérée. En effet, il a pu être observé une bioconversion du témoin érythrine (Tampon Phosphate pH7) en montagnétol à partir de J8 pour MOLA1528 alors que MOLA1522 a montré une bioconversion directement en acide orsellinique au bout de J11. Au contraire, les souches MOLA1545 et MOLA1554 ont montré une bioconversion du témoin érythrine en 24h d'incubation en montagnétol (dès J1). A partir de 8 jours d'incubation, MOLA1545 et MOLA1554 avaient bioconverti totalement le montagnétol en acide orsellinique alors qu'il a fallu 4 jours supplémentaires (J11) pour la souche MOLA1528 pour n'observer plus qu'uniquement l'acide orsellinique (Figure 111).

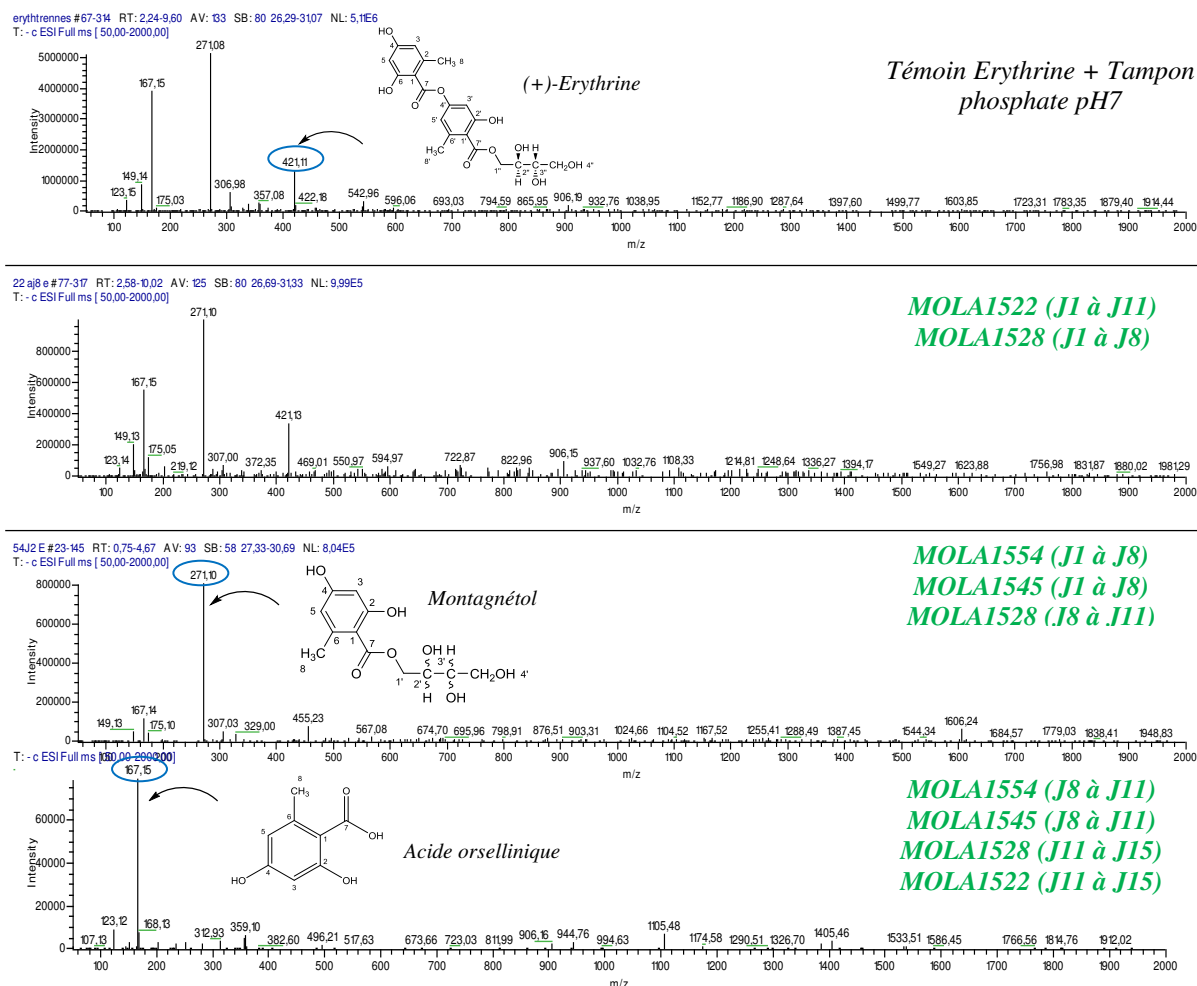


Figure 111 : Spectres de masses ( $[M-H]^-$   $m/z$ ) des différentes étapes de dégradation de l'érythrine par ces quatre bactéries associées à *Rocella fuciformis*

Ainsi, l'érythrine ou plus particulièrement l'érythrine et ces produits de dégradation ont été bioconvertés par ces quatre *Actinobacteria* mais à une échelle de temps différente. On a pu également mettre en évidence que deux mêmes espèces (MOLA1528 et MOLA1545) ne possèdent pas forcément le même mode et temps de bioconversion de ce métabolite ceci potentiellement lié au bagage enzymatique de chaque bactérie et en l'occurrence selon le type d'estérase (Figure 112).<sup>136</sup>

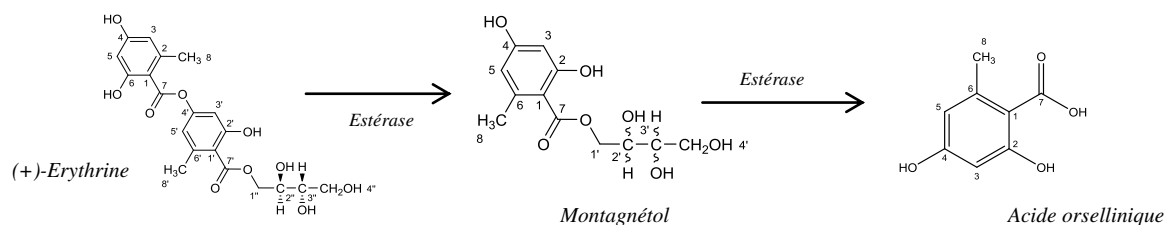


Figure 112 : Schéma de dégradation de l'érythrine et enzymes impliquées

<sup>136</sup>Mosbach, K., and Ehrensward, U.(1966) *Biochemical Biophysical. Research Communication* 22, 145–150.

### 3. Conclusion et perspectives

Une mesure de viabilité de culture bactérienne par le MTT a été optimisée en microplaque et mise en place sur des *Actinobacteria*. Ainsi, à travers cette optimisation, on a pu montrer l'adaptation d'une méthode existante pour des bactéries de coloration Gram positive et en plaque 96 puits.

A partir de cette étude de « Co-culture » mise en place, on a pu mettre en évidence la non implication de certains métabolites seuls de *Rocella fuciformis* sur la croissance bactérienne de quatre *Actinobacteria* représentatives de la communauté bactérienne cultivable associée à ce lichen, bien que l'un d'entre eux (acide léprarique) ait montré un faible potentiel antibactérien sur des souches pathogènes de coloration Gram positive (*Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*). Cependant, leur influence possible sur le métabolisme bactérien a pu être soulevée.

Dans un deuxième temps, à travers l'étude de bioconversion de l'acide léprarique et l'érythrine, il a été mis en évidence la capacité de bioconversion de « l'érythrine » par ces quatre souches bactériennes mais pas des produits de dégradation de l'acide léprarique. Par conséquent, les modifications du métabolisme bactérien en présence d'érythrine pourraient être expliquées par cette capacité de bioconversion.

Dans une perspective à deux échelles, il serait intéressant de tester l'effet combiné de plusieurs métabolites lichéniques sur la croissance bactérienne ainsi que celui d'un extrait total. Deuxièmement, une optimisation de la solution Tampon Phosphate pH 7 serait nécessaire pour confirmer la non bioconversion de l'acide léprarique et la bioconversion de l'érythrine par ces bactéries. Dans une optique plus large de compréhension des interactions possibles entre les communautés bactériennes associées et les lichens (photobionte et mycobionte), il serait intéressant (1) de cultiver les bactéries les plus « abondantes », (2) de marquer les molécules introduites dans les cultures au  $^{14}\text{C}$  afin de suivre l'intégration ou non de ces molécules ou de leurs produits de dégradation (engendrés ou non par les bactéries) dans leurs propres molécules synthétisées. Mais cependant, toutes ces expériences de laboratoire possibles ne reflètent pas la réalité des échanges et interactions possibles se produisant pour un lichen dans leurs propres environnements.



## Références bibliographiques (Chapitre 2)

---

- (98) Bertrand, J.-C., Caumette, P., Lebaron, P., Matheron, R., and Normand, P. (2011) Ecologie microbienne Microbiologie des milieux naturels et anthropisés Presses universitaire des Pays de l'Adour, p 1002.
- (99) Ismed, F. (2012) Phytochimie de lichens du genre *Stereocaulon* : étude particulière de *S. halei* Lamb et *S. montagneanum* Lamb , deux lichens recoltés en Indonésie. Université de Rennes 1, p 284.
- (100) Grube, M., Berg, G., Andr sson,  . S., Vilhelmsson, O., Dyer, P. S., and Miao, V. P. W. (2014) Lichen Genomics : Prospects and Progress, in *The Ecological Genomics of Fungi*, pp 191–212.
- (101) Schneider, T., Schmid, E., de Castro, J. V, Cardinale, M., Eberl, L., Grube, M., Berg, G., and Riedel, K. (2011) Structure and function of the symbiosis partners of the lung lichen (*Lobaria pulmonaria* L. Hoffm.) analyzed by metaproteomics. *Proteomics* 11, 2752–6.
- (102) Cardinale, M., Steinová, J., Rabensteiner, J., Berg, G., and Grube, M. (2012) Age, sun and substrate: triggers of bacterial communities in lichens. *Environmental Microbiology Reports* 4, 23–28.
- (103) Cardinale, M., Grube, M., and Berg, G. (2011) *Fron dihabitans cladoniiphilus* sp. nov., an actinobacterium of the family *Microbacteriaceae* isolated from lichen, and emended description of the genus *Fron dihabitans*. *International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology* 61, 3033–8.
- (104) Motohashi, K., Takagi, M., Yamamura, H., Hayakawa, M., and Shin-ya, K. (2010) A new angucycline and a new butenolide isolated from lichen-derived *Streptomyces* spp. *Journal of Antibiotics* 63, 545–548.
- (105) Cheenpracha, S., Vidor, N. B., Yoshida, W. Y., Davies, J., and Chang, L. C. (2010) Coumabiocins A-F , Aminocoumarins from an Organic Extract of *Streptomyces* sp . L-4-4. *Journal of Natural Products* 73, 880–884.
- (106) Williams, D. E., Davies, J., Patrick, B. O., Bottriell, H., Tarling, T., Roberge, M., and Andersen, R. J. (2008) Cladoniamides A-G Tryptophan-Derived Alkaloids Produced in Culture by *Streptomyces uncialis*. *Organic Letters* 10, 3501–3504.
- (107) Selbmann, L., Zucconi, L., Ruisi, S., Grube, M., Cardinale, M., and Onofri, S. (2009) Culturable bacteria associated with Antarctic lichens: affiliation and psychrotolerance. *Polar Biology* 33, 71–83.
- (108) Printzen, C., Fernández-Mendoza, F., Muggia, L., Berg, G., and Grube, M. (2012) Alphaproteobacterial communities in geographically distant populations of the lichen *Cetraria aculeata*. *FEMS Microbiology Ecology* 82, 316–25.
- (109) Ellis, C. J., Crittenden, P. D., Scrimgeour, C. M., and Ashcroft, C. J. (2005) Translocation of 15N indicates nitrogen recycling in the mat-forming lichen *Cladonia portentosa*. *New Phytology* 168, 423–34.
- (110) Gtari, M., Ghodhbane-Gtari, F., Nouioui, I., Beauchemin, N., and Tisa, L. S. (2012) Phylogenetic perspectives of nitrogen-fixing actinobacteria. *Archives in Microbiology* 194, 3–11.
- (111) Jean, M., Tomasi, S., and van de Weghe, P. (2012) When the nine-membered enediynes play hide and seek. *Organics Biomolecular Chemistry* 10, 7453–6.

- (112) Kim, O.-S., Cho, Y.-J., Lee, K., Yoon, S.-H., Kim, M., Na, H., Park, S.-C., Jeon, Y. S., Lee, J.-H., Yi, H., Won, S., and Chun, and J. (2012) Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology* 65, 716–721.
- (113) Lozupone, C., and Knight, R. (2005) UniFrac : a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 8228–8235.
- (114) Hertweck, C. (2009) The biosynthetic logic of polyketide diversity. *Angewandte Chemie International Edition* 48, 4688–716.
- (115) Schrempf, H. (2006) The Family *Streptomycetaceae*, Part II : Molecular Biology. *Prokaryotes* 3, 605–622.
- (116) Kämpfer, P. (2006) The Family *Streptomycetaceae* , Part I: Taxonomy. *Prokaryotes* 3, 538–604.
- (117) Olano, C., Méndez, C., and Salas, J. A. (2009) Antitumor compounds from marine *actinomycetes*. *Marine Drugs* 7, 210–48.
- (118) Martínez-Luis, S., Gómez, J. F., Spadafora, C., Guzmán, H. M., and Gutiérrez, M. (2012) Antitrypanosomal alkaloids from the marine bacterium *Bacillus pumilus*. *Molecules* 17, 11146–55.
- (119) Rui, H., Bochu, W., Wakimoto, T., Manyuan, W., Liancai, Z., and Ikuro, A. (2013) Cyclopeptides from metagenomic library of a japanese marine sponge. *Journal of Brazilian Chemical Society* 24, 1926–1932.
- (120) Begum, A. S., Basha, S. A., Raghavendra, G., Venkata, M., Kumar, N., Singh, Y., Patil, J. V., Tanemura, Y., and Fujimoto, Y. (2014) Isolation and Characterization of Antimicrobial Cyclic Dipeptides from *Pseudomonas fluorescens* and Their Efficacy on Sorghum Grain Mold Fungi. *Chemical Biodiversity* 11, 92–100.
- (121) Bernart, M., and Gerwick, W. H. (1990) 3-(Hydroxyacetyl)indole, a plant growth regulator from the oregon red alga *Prionitis lanceolata*. *Phytochemical Analysis* 29, 3697–3698.
- (122) Yang, S.-W., and Cordell, G. A. (1997) Metabolism studies of indole derivatives using a staurosporine producer, *Streptomyces staurosporeus*. *Journal of Natural Products* 60, 44–48.
- (123) Borthwick, A. D. (2012) 2,5-Diketopiperazines: synthesis, reactions, medicinal chemistry, and bioactive natural products. *Chemical Reviews* 112, 3641–3716.
- (124) Zhou, X., Xu, T., Yang, X., Liu, Y., and Utilization, S. (2010) Diketopiperazines from Marine Organisms. *Chemical Biodiversity* 7, 2809–2829.
- (125) Carvalho, M. P., and Abraham, W. R. (2012) Antimicrobial and biofilm inhibiting diketopiperazines. *Current Medicinal Chemistry* 19, 3564–3577.
- (126) Jihong, J., Bo, Y., Yongqiang, C., Youjian, F., Fengmei, C., Xiuyun, J., Li, W., Xiaoying, C., Sheng, Q., Jinjuan, L., and Guangkai, B. Fermentative production of 2-methyl-actinomycin D by *Streptomyces recifensis* (2012) Brevet CN102617707A, p 14.
- (127) Praveen, V., and Tripathi, C. K. M. (2009) Studies on the production of actinomycin-D by *Streptomyces griseoruber* - a novel source. *Letters and Applied Microbiology* 49, 450–5.

- (128) Hollstein, U. (1973) Actinomycin. Chemistry and Mechanism of Action. *Chemical Reviews* 74, 625–652.
- (129) Yan, P., Song, Y., Sakuno, E., Nakajima, H., Nakagawa, H., and Yabe, K. (2004) Cyclo ( L - Leucyl- L -Prolyl ) Produced by *Achromobacter xylosoxidans* Inhibits Aflatoxin Production by *Aspergillus parasiticus*. *Applied Environmental Microbiology* 70, 7466–7473.
- (130) Biebl, H., Tindall, B. J., Lu, H., Allgaier, M., and Wagner-do, I. (2006) *Hoeflea phototrophica* sp . nov ., a novel marine aerobic alphaproteobacterium that forms bacteriochlorophyll a. *International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology* 56, 821–826.
- (131) Fiebig, A., Pradella, S., Petersen, J., Michael, V., Päucker, O., Rohde, M., Göker, M., Klenk, H.-P., and Wagner-Döbler, I. (2013) Genome of the marine alphaproteobacterium *Hoeflea phototrophica* type strain (DFL-43(T)). *Standards Genomic Sciences* 7, 440–8.
- (132) Soliev, A. B. (2012) Pigmented bioactive compounds from marine bacteria and their mechanisms of action involved in cytotoxicity. Université de Kochi, Japon, p 120.
- (133) Bruns, N., Glukhov, E., Wodtke, A., and Felicio, R. De. (2014) Molecular Networking as a Dereplication Strategy. *NIH Journal of Natural Products* 76, 1686–1699.
- (134) Garg, N., Kaponov, C., Lim, Y. W., Koyama, N., Vermeij, M. J. a., Conrad, D., Rohwer, F., and Dorrestein, P. C. (2014) Mass spectral similarity for untargeted metabolomics data analysis of complex mixtures. *International Journal of Mass Spectrometry* (sous presse)
- (135) Wang, H., Cheng, H., Wang, F., Wei, D., and Wang, X. (2010) An improved 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) reduction assay for evaluating the viability of *Escherichia coli* cells. *Journal of Microbiology Methods* 82, 330–3.
- (136) Mosbach, K., and Ehrensward, U. (1966) Studies on lichen enzymes Part1. Preparation and properties of a depside hydrolysing esterase and of orsellinic acid decarboxylase. *Biochemical Biophysical Research Communication* 22, 145–150.

## *Conclusion et Perspectives*

---



## CONCLUSION & PERSPECTIVES.

---

Les lichens sont donc des organismes complexes ayant la capacité à s'adapter à leurs environnements et produisant des métabolites spécifiques à potentiel biologique varié et divers.

Au travers de cette étude lichénique, de nombreux points ont été mis en évidence. Tout d'abord, une méthode d'extraction a été optimisée et a permis de mettre en évidence l'impact du système de broyage, des solvants d'extraction, de la proportion solide/liquide ou encore de l'agitation sur le rendement d'extraction et de déterminer les meilleures conditions pour obtenir des profils chimiques les plus complets possibles. Par la suite, le profilage chimique qualitatif de l'ensemble des 9 espèces lichéniques étudiées a montré la similarité métabolomique entre les différents cyanolichens (*Collema auriforme*, *C. cristatum*, *C. fuscovirens*, *Lichina confinis*, *L. pygmaeae*, *Leptogium lichenoides* et *Synalissa symphorea*) d'une part et les deux espèces lichéniques à algue verte (*R. fuciformis* et *R. phycopsis*) d'autre part rapprochant ainsi les profils métaboliques en fonction de la nature du photobionte (algues verte ou cyanobactéries) plus qu'en fonction de leurs environnements géographiques (côtiers ou terrestres). Différents métabolites connus ont ainsi pu être mis en évidence par LC/MS pour les deux espèces lichéniques du genre *Roccella* mais très peu, voire aucun métabolite connu n'a été mis en évidence pour les 7 cyanolichens. Par conséquent, la composition chimique des cyanolichens reste encore énigmatique.

L'étude chimique de *R. phycopsis* et de *R. fuciformis* a permis d'isoler et d'identifier 9 métabolites connus en quantité suffisante pour étudier leurs propriétés biologiques. Ainsi, parmi les quatre métabolites testés (acétylportentol, érythrine, acide léprarique et acide roccellique), des propriétés antioxydantes (érythrine et acide léprarique) ont été mises en évidence mais aucune propriété antibactérienne n'a été observée.

De plus, les lichens sont également associés à des champignons épiphythiques et endophythiques (plus de 1500 espèces sont décrites à l'heure actuelle). Et depuis quelques années, les lichens ont été également décrits comme présentant des communautés bactériennes à leur surface comme à l'intérieur du thalle lichénique. Ainsi, les lichens, définis comme l'association entre un photobionte et un mycobionte, constituent un véritable micro-écosystème où les différents partenaires interagissent entre eux à des degrés plus ou moins définis. Ainsi, les lichens constituent un modèle d'étude dans la compréhension des interactions symbiotiques, pour la recherche de molécules d'intérêts, et notamment dans la recherche de nouvelles molécules bioactives à partir des communautés microbiennes (champignons comme bactéries) leur étant associées. Au travers de l'étude des bactéries associées à des lichens, de nombreuses souches bactériennes cultivables (247 souches bactériennes) ont été isolées de quatre lichens marins/maritimes (*Lichina confinis*, *L. pygmaeae*, *Roccella fuciformis*) et terrestre (*Collema auriforme*).

Les lichens sont donc une source bactérienne non négligeable et cette diversité est fortement dépendante des conditions de culture. En outre, quelques souches bactériennes sont connues pour être productrices de métabolites d'intérêts (*Streptomycetaceae*, *Nocardiodaceae*, *Pseudonocardiodaceae*, *Promicromonosporaceae* par exemple), ce qui a été mis en évidence au cours d'un criblage biologique (génétique : PKS et antibactérien). En effet, 8 familles d'*Actinobacteria* (*Microbacteriaceae*, *Micrococcaceae*, *Streptomyces*, *Mycobacteriaceae*, *Cellulomonadaceae*, *Nocardiodaceae*, *Brevibacteriaceae* et *Pseudonocardiodaceae*) se sont révélées être PKS I et/ou PKS II positifs. De plus, 12.6% des souches bactériennes cultivables totales présentent un potentiel de production de métabolites d'intérêts et en l'occurrence antibactériens non négligeable.

D'un autre côté, l'étude chimique de deux souches bactériennes associées soit à *Lichina confinis* (MOLA1488) soit à *Lichina pygmaea* (MOLA1416) ont permis d'isoler et d'identifier divers métabolites. En effet, à partir de deux cultures liquides de la souche MOLA1488, neuf métabolites différents ont été isolés. Parmi ces neuf composés, six ont été identifiés structurellement (2 dicétopipérazines : **D7** et **D8** ; un indole (**D2**), un dérivé tryptamine (**D10**) ainsi que la *N*-Me-dactinomycine (**D9**) et trois sont en cours d'identification. A l'heure actuelle, un nouveau métabolite (**D12**) a été isolé à partir de cette souche bactérienne. L'ensemble des métabolites identifiés ont été testés à l'exception du composé **D12** et ont montré des propriétés cytotoxiques importantes. A partir de la souche MOLA1416, six métabolites différents ont été isolés. Parmi ces six composés, trois ont été identifiés structurellement (une prodigiosine (**R1**), une dicétopipérazine (**R2**) et un diester aromatique (**R11**)) et trois sont en cours d'identification. A l'heure actuelle, une source naturelle nouvelle du métabolite **R11** a été mise en évidence : *Hoeflea phototrophica* (MOLA1416). En plus du composé **R2** (= **D8** de MOLA1488), le composé **R1** a montré des propriétés cytotoxiques intéressantes ( $CI_{50}$  2.6.10<sup>-2</sup> +/- 1.3.10<sup>-2</sup> µg/mL sur les lignées B16 et de 0.6 +/- 0.07 µg/mL sur les lignées cellulaires HaCaT).

De plus, l'étude de dérégulation par LC-ESI-MS/MS mise en place sur 10 extraits bactériens a permis de mettre en évidence la présence ubiquitaire de dicétopipérazines par une méthode basée sur les similarités de fragmentation des composés.

Enfin, dans un but de mettre en évidence les impacts du métabolisme lichénique sur le métabolisme bactérien, une étude d'extraits lichéniques associées à des cultures bactériennes a été mise en place. On a pu mettre en évidence la non implication de certains métabolites seuls de *Roccella fuciformis* sur la croissance bactérienne de quatre *Actinobacteria* représentatives de la communauté bactérienne cultivable associée à ce lichen, bien que l'un d'entre eux (acide léprarique) ait montré un faible potentiel antibactérien sur des souches pathogènes de coloration Gram positif (*Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*). Cependant, leur influence possible sur le métabolisme bactérien a pu être soulevée.

Dans un deuxième temps, à travers l'étude de bioconversion de l'acide léprarique et l'érythrine, il a été mis en évidence la capacité de bioconversion de l'érythrine ou plus particulièrement de ces produits de dégradation par ces quatre souches bactériennes mais pas des produits de dégradation de l'acide léprarique. Par conséquent, les modifications du métabolisme bactérien en présence d'érythrine pourraient être expliquées par cette capacité de bioconversion.

Des travaux ultérieurs seront nécessaires pour (1) la détermination structurale (RMN, configuration absolue ...) de certains métabolites isolés de ces deux souches (MOLA1488 et MOLA1416) bactériennes, (2) l'évaluation biologiques des métabolites et (3) la compréhension des différences d'activités entre la souche, l'extrait total et les métabolites isolés. Une optimisation des conditions de cultures (solide/liquide, températures, stress...) sera à mettre en place pour augmenter les rendements d'extraction des métabolites. De façon plus générale, il serait intéressant de poursuivre l'étude de ces souches bactériennes dont certaines montrent des propriétés biologiques intéressantes en utilisant systématiquement une méthode de dérégulation pour faciliter l'identification de nouveaux métabolites bioactifs. Pour ce dernier point, il serait important d'avoir accès à des bases de données notamment de fragmentation en masse plus complètes. Il serait également d'étudier la diversité bactérienne non cultivable puis le métagénome des souches bactériennes majoritaires associées afin de trouver des conditions de culture permettant leur croissance ou des enzymes impliquées dans leur métabolisme. De plus, en lien avec l'influence potentielle du métabolisme lichénique sur le métabolisme bactérien, des études de culture en présence d'extraits lichéniques pourraient permettre de diversifier la production chimique des bactéries considérées et donc de découvrir de nouveaux métabolites bioactifs d'intérêts.





## *Matériels & Méthodes*

---



# Matériels & Méthodes.

---

## 1. Procédure générale

### 1.1. Solvants et réactifs

Tous les solvants et les réactifs de haute qualité ont été fournis par Sigma-Aldrich (Lyon, France), Carlo Erba Reactifs (Val de Reuil, France), VWR (Fontenay sous bois, France), Acros Organics (Halluin, France) ... Les solvants utilisés dans le cadre des méthodes analytiques (notamment CLHP et LC-MS) étaient des solvants de qualité CLHP, préalablement dégazés aux ultrasons et l'eau de qualité ultra-pure. Les solvants utilisés pour les séparations des composés en plus grande quantité étaient des solvants de qualité analytique VWR (Fontenay sous bois, France).

### 1.2. Méthodes séparatives

#### *1.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM) préparative*

Les chromatographies sur couche mince préparatives ont été réalisées sur des plaques recouvertes de gel de silice 60 PF<sub>254</sub> (5-40 µm, Merck), préparées au laboratoire ou commercialisées (DC-Fertiltatten SIL G-25/UV<sub>254+366</sub>, Macherey Nage, Germany).

#### *1.2.2. Chromatographie sur colonne sous pression : Chromatographie de type flash*

L'appareil utilisé était un SPOT Liquid Chromatography Flash® (Armen Instrument) qui permet d'éluer sous pression les solutés. Des colonnes de silice (SiO<sub>2</sub>) prépackées de 25 g (FSHP-1207-0025 ; 25 g ; 33 mL ; 20-40 mL/min ; 20 à 100 mg, Biotage, en phase normale) ont été utilisées. Les paramètres ont été établis à l'aide du logiciel ARMEN glider flash V3.1e.06.

### 1.3. Méthodes analytiques

#### *1.3.1. Chromatographie sur couche mince (CCM) analytiques*

Les CCM ont été réalisées sur des plaques d'aluminium recouvertes d'un gel de silice (SiO<sub>2</sub>) avec indicateur de fluorescence (10-12 µm, Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, Merck 5554), en phase normale. Après migration des plaques dans une ou des phases mobiles appropriées, ces dernières ont été observées sous UV à 254 nm, 312 nm et 365 nm. Les chromatogrammes ont été ensuite révélés par une des solutions suivantes :

- **Anisaldéhyde sulfurique (ANS)** : 0.5 mg de méthoxybenzaldéhyde dissous dans 85 mL de méthanol et 10 mL d'acide acétique glacial. Puis, 2% d'acide sulfurique concentré sont

extemporanément additionnés. Chauffage à 100°C après pulvérisation. Révélateur des stéroïdes, des saponines, des terpènes et des iridoïdes. Les composés sont alors visibles à la lumière naturelle et les couleurs sont très variables en fonction des composés révélés : brunes à roses, bleues ou violacées.

- **Ninhydrine** : 0.3 g de ninhydrine dissous dans 100 mL de *n*-Butanol et 3 mL d'acide acétique. Chauffage à 100°C après pulvérisation. Les composés apparaissent alors dans le visible sous la couleur rose à violette. Ce révélateur permet de mettre en évidence les composés ayant une ou des fonctions amines primaires (NH<sub>2</sub>) dans leur structure.

- **Primuline** : 10 mg de primuline dissous dans 100 mL du mélange acétone/H<sub>2</sub>O (80/20). Après séchage sous hotte pendant 30-45 min (sans chauffage), la révélation se fait sous UV à 312 nm et 365 nm par l'observation de spots de couleur blanche. Elle permet de mettre en évidence des composés possédant une ou des chaînes aliphatiques : acides gras, triacylglycérol, composés aliphatiques ...

- **FeCl<sub>3</sub> (5%)** : 5 g de FeCl<sub>3</sub> (6H<sub>2</sub>O) dissous dans 100 mL de MeOH. Chauffage à 100°C après pulvérisation. Les composés apparaissent en lumière visible de couleur noire. Ce réactif permet de mettre en évidence les composés ayant la capacité de chélater le Fer.

- **Thymol sulfurique** : 1g de thymol dans 100 mL du mélange éthanol/acide sulfurique (9:1). Chauffage à 120°C pendant 10-15 min après pulvérisation. Révélateur des sucres et des composés glycosylés. Les composés apparaissent en lumière visible et ils sont de couleur rose, rouge violacé à orangé ou brun pâle.

### *1.3.2. Chromatographie sur couche mince haute performance (HPTLC)*

Les CCM ont été réalisées sur des plaques d'aluminium recouvertes d'un gel de silice (SiO<sub>2</sub>) avec indicateur de fluorescence (10-12 µm, Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, Merck 5554), en phase normale. Les dépôts ont été réalisés par un déposeur automatique d'échantillons (Automatic TLC sampler III, Camag®). Après migration, les chromatogrammes ont été observés sous UV (254 nm, 312 nm et 365 nm) et révélés par différentes solutions (cf. 1.3.1). L'acquisition des paramètres a été contrôlée par le logiciel WinCATS.

### *1.3.3. Chromatographie liquide haute performance (CLHP) couplée à un détecteur à barrettes de diodes (DAD)*

Les analyses ont été réalisées soit sur un appareil de type Kontron series 325 équipé d'un détecteur à barrette de diode (Kontron, 350A) soit sur un appareil de type Shimadzu équipé d'un détecteur à barrette de diode (SPD-M20A) ou soit sur un appareil de type Dionex équipé d'un

détecteur à barrette de diode (DAD-3000RS). Deux colonnes en phase inverse C18 (Waters Spherisorb® ODS2 (150 mm x 4.6 mm, 5 µm) et Spherisorb® 50DS2 NAK J5855 Kontron (125 mm x 4.6 mm, 5µm)) ont été utilisées. L'élution a été réalisée à l'aide d'un gradient : A (ACN) et B (H<sub>2</sub>O), à un débit variant de 0.4 mL/min à 1 mL/min selon la colonne et l'appareil CLHP utilisés. Différents gradients ont été mis au point selon la complexité des échantillons analysés.

20 µL d'échantillons à 1 mg/mL ont été injectés après solubilisation dans le solvant approprié. L'élution a été contrôlée principalement à 4 quatre longueurs d'onde (254, 280, 312 et 365 nm). Les données sont acquises et analysées à l'aide des logiciels Geminix, LabSolutions version 5.54 SP2 ou Chromeleon version 6.8.

#### *1.3.4. Chromatographie liquide haute performance (CLHP) couplée à un détecteur à barrettes de diodes et de masse (LC-ESI-MS/MS)*

Le système chromatographique utilisé (Plateforme P2M2, INRA, Le Rheu, France) est constitué d'un passeur d'échantillon automatique thermostaté Surveyor® et muni d'un four à colonne, d'un dégazeur de solvants par bullage d'hélium, d'une pompe binaire haute pression et d'un détecteur à barrettes de diodes. La sortie est directement connectée à la source d'électronébulisation (ESI), sans dérivation. La séparation est réalisée sur une colonne C18 munie d'une pré-colonne XDB C18 150 x 2,1 mm (Agilent).

##### - Détecteur à barrette de diode :

Ce type de détecteur fournit en plus du chromatogramme, des spectres UV-Visible de l'ensemble des flux passant dans la cellule de détection. Les spectres recueillis donnent une indication sur l'identité des composés séparés. Il comprend une source lumineuse double, un banc d'optique, un réseau de photodiodes et une alimentation basse tension.

La double source lumineuse comprend une lampe à deutérium pour la détection dans la gamme de longueur d'onde UV (190-400 nm) et une lampe à halogène de tungstène pour la détection dans le visible (400-500 nm).

##### - Système de spectrométrie de masse :

Le détecteur est un spectromètre de masse LCQ Deca® équipé d'une source d'électronébullisation ou électrospray (ESI) à géométrie axiale pour assurer l'ionisation. L'analyseur est de type piège à ions. L'hélium est utilisé comme gaz de collision et de focalisation.

L'analyseur de masse est composé d'un quadripôle, d'un octapôle, d'une lentille inter-octapôle et d'une trappe d'ions. Le quadripôle est un cylindre formé par quatre tiges carrées et l'octapôle est un cylindre formé par huit tiges cylindriques. Ils agissent comme un dispositif de transmission d'ions. Une tension est appliquée aux tiges ; elle engendre un champ électrique qui oriente les ions le long de l'axe du quadripôle et de l'octapôle. Le quadripôle et l'octapôle sont séparés

par la lentille inter-octapôle. L'inter-octapôle sert de déflecteur entre la région du quadripôle et la région de l'analyseur. La trappe d'ions est un quadripôle à trois dimensions, constitué d'une électrode annulaire et de deux électrodes « chapeaux » de section hyperbolique. Les ions sont soumis à une fréquence de tension tridimensionnelle et vont être orientés vers le détecteur pour être analysés.

Le spectromètre a été utilisé soit en infusion, soit en couplage CLHP. L'infusion a été réalisée à l'aide d'un pousse-seringue intégré au LCQ Deca, d'une seringue de 250  $\mu\text{L}$  et d'un tube en PPEK de 0,013 mm de diamètre interne et de 50 cm de longueur.

L'acquisition et le traitement des données ont été réalisés par le logiciel Xcalibur 1.0.

Des analyses métabolomiques afin d'organiser les données de spectrométrie de masse obtenues ont été réalisées en utilisant la plateforme GnPS (Global Natural Products Social Molecular Networking, Université de San Diego, Californie, USA) et le logiciel Cytoscape (versions 2.8 ou 3.1.0 selon les modules nécessaires) pour visualiser ces dernières.

### *1.3.5. Spectrométrie de Résonnance Magnétique Nucléaire*

Les différents appareils ayant été utilisés sont :

- Appareil à transformée de Fourier BRUKER DMX 300 (300 MHz pour le  $^1\text{H}$  et 75 MHz pour le  $^{13}\text{C}$ ) (Equipe PNSCM, Rennes, France).
- Appareil à transformée de Fourier BRUKER 500 et cryo500 (500 MHz pour le  $^1\text{H}$  et 125 MHz pour le  $^{13}\text{C}$ ) (Plateforme PRISM, Rennes, France).

Les spectres ont été réalisés dans différents solvants deutérés :  $\text{CDCl}_3$ , Acétone- $d_6$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , DMSO- $d_6$ . Les déplacements chimiques ( $\delta$ ) et les constantes de couplages ( $J$ ) sont exprimés en partie par millions (ppm) et en Hertz (Hz) respectivement. La multiplicité des signaux est indiquée comme suit : s (singulet), bs (singulet large), d (doublet), t (triplet), m (multiplet), dd (doublet dédoublé), etc ... Les données ont été traitées à l'aide des logiciels suivants : Topspin version 3.2, ACDlab NMR Processor version 12 ou MestReNova.

### *1.3.6. Spectre de masse haute résolution (HRMS)*

Les spectres de masse de haute résolution ont été réalisés au sein du laboratoire du CRMPO (Centre Régional des Mesures Physique de l'Ouest) de l'Université de Rennes 1. Selon les métabolites analysés et leurs capacités d'ionisation, différents appareils ont été utilisés : Q-ToF 2, Q-Exactive ou MicrOTOF-Q-II ainsi que différents solvants :  $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{CH}_3\text{OH}$  (95/5),  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (90/10) par exemple.

### 1.3.7. Pouvoir Rotatoire

Le pouvoir rotatoire ( $[\alpha_D^{20}]$ ) a été mesuré à l'aide d'un polarimètre Perkin Elmer Model 341, à la longueur d'onde de la raie D du sodium (598 nm) et à une température de 25 °C. Ce pouvoir rotatoire est ensuite déterminé à partir de la formule ci-dessous :

$$[\alpha_D^{20}] = [\alpha_D^{20}]_{\text{mesuré}} / (l \times C)$$

avec l : longueur de la cuve en cm

C : concentration de la solution en g/L

$[\alpha_D^{20}]$  : en  $\text{dm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^3$

### 1.3.8. Tests biologiques

#### 1.3.8.1. Activités antibactériennes

Les extraits et les composés purs ont été testés, aux concentrations désirées vis-à-vis de 5 cibles bactériennes : *Staphylococcus aureus* (CIP4.38), *S. epidermidis* (CIP8155 et CIP6821), *Escherichia coli* (CIP53126) et *Pseudomonas aeruginosa* (CIP100.720).

Les cibles ont été mises en culture solide sur milieu Luria Broth (LB) agar 24h avant la réalisation des antibiogrammes à 37 °C. Par la suite les cibles bactériennes ont été diluées dans 10 mL d'eau stérile afin d'obtenir un trouble correspondant à 0.5 sur l'échelle de McFarland. Cette solution a été diluée par la suite au 1/10 dans de l'eau stérile. L'ensemencement sur les milieux Müller Hilton agar a été réalisé par écouvillonnage. Les disques contenant les solutions à tester ont été déposées sur les géloses ensemencées par la cible et incubées à 37 °C pendant 24h. La présence d'activité antibactérienne a été repérée par la formation d'un diamètre d'inhibition qui a été mesuré.

La détermination de la CMI par la suite a été réalisée en microplaque. Deux gammes de concentrations ont été testées pour les extraits et les composés purs : (1) 256 mg/mL à 0.5 mg/mL ou de (2) 256 µg/mL à 0.5 µg/mL (dilution de demi en demi). Les tests ont été réalisés en duplicata.

Chaque puits est constitué de : 190 µL de milieu de culture TSB (Tryptic soy Broth), 10 µL de l'extrait ou du composé pur solubilisé dans le DMSO à la concentration souhaitée et de 100 µL de suspension bactérienne. Cette suspension bactérienne correspond à un trouble de 0.5 de McFarland dilué lui-même au 1/20<sup>ème</sup> dans le milieu TSB.

La CMI de témoins positifs (ofloxacin, céfotaxime et chloramphénicol) vis-à-vis des 5 cibles bactériennes a également été déterminée de la même manière que ci-dessus. La gamme de concentration testée s'étendait de 1500 µg/mL à 0.03 µg/mL et les CMI obtenues sont les suivantes (**Tableau 36**).



**Tableau 36** : CMI en µg/mL des antibiotiques de références utilisés

Antibiotiques	<i>S. aureus</i> CIP 4.38	<i>S. epidermidis</i> CIP 81.55	<i>S. epidermidis</i> CIP 68.21	<i>E. coli</i> CIP 53126	<i>P. aeruginosa</i> CIP 100720
Ofloxacin	600	15	15	7.5	75
Cefatoxime	75	30	22.5	150	375
Chloramphénicol	600	300	225	> 1500	> 600

### 1.3.8.2. Propriétés cytotoxiques

Les tests de cytotoxicité ont été réalisés sur deux lignées cellulaires : les cellules HaCaT et les cellules B16-F10.

Les cellules HaCaT sont issues d'une lignée non cancéreuse de kératinocytes humains. Cette lignée se rapproche de la composition du derme humain. Les cellules HaCaT sont cultivées dans du milieu RMPI 1640 supplémenté par 5% de sérum de veau fœtal et antibiotique et sous une atmosphère contrôlée à 5% de CO<sub>2</sub> et 37°C.

Les cellules B16-F10 sont des mélanocytes murins (LGC, ATCC, CRL-6475-melanoma mouse). Ces cellules sont cultivées dans du milieu RMPI 1640 supplémenté par 5% de sérum de veau fœtal sous une atmosphère contrôlée à 5% de CO<sub>2</sub> et 37°C.

Pour réaliser l'ensemencement en plaques de 96 puits, les cellules sont trypsinées, comptées grâce à une cellule de nageotte. Les plaques sont ensuite incubées dans l'étuve (à 37°C) pendant 24 heures pour permettre leur adhésion au support et c'est à l'issue de ces 24 heures, que les substances seront mises à incuber avec les cellules. Au bout de 48h d'incubation, la viabilité cellulaire est évaluée grâce au test du MTT : ce sel de tétrazolium de couleur jaune, est transformé par les déshydrogénases mitochondriales des cellules viables en cristaux de formazan violet. Cette coloration est proportionnelle au nombre de cellules vivantes et la lecture au spectrophotomètre se fait à 540 nm (appareil Multiskan FC)

Un ou deux témoins anticancéreux ont été utilisés : la doxorubicine et la vincristine.

Les analyses de cytotoxicité au sein de la plateforme ImpacCell (Biosit, Rennes) ont été effectuées sur les lignées cellulaires suivantes :

- **Caco2 (REF ECACC: 86010202)**: Lignée tumorale humaine de colon ; cellules de type épithélial ; capacité à développer un programme de différenciation de type entérocytaire ; acquisition d'une polarité cellulaire ; présence de transporteurs membranaires.
- **HCT-116 (REF ECACC: 91091005)**: Lignée tumorale humaine de colon ; cellules de type épithélial à haute capacité proliférative ; Développement de tumeurs si injectées en sous-cutané à des souris Nude.
- **Huh-7D12 (REF ECACC: 01042712)**: Lignée d'hépatome humain ; cellules de type épithélial exprimant plusieurs marqueurs fonctionnels hépatocytaires. Prolifération active. Faible développement de tumeurs par xénogreffe dans la souris Nude.

- **MDA-MB 231 (REF ECACC: 92020424)**: Lignée de carcinome mammaire humain.
- **PC3 (REF ECACC: 90112714 )**: Lignée tumorale humaine de prostate.
- **NCI-H727(REF ECACC: 94060303)**: Lignée tumorale humaine pulmonaire.
- **HaCaT** : Lignée de kératinocytes humains.
- **Lignée diploïde de fibroblastes de peau humaine**. Obtention de la Société BIOPREDIC

## 2. Matériels & Méthodes de la Partie 2

### 2.1. Identification des lichens : réactions thallines

Les réactions thallines consistent en l'application de divers réactifs sur le cortex et/ou sur la partie médullaire des thalles. Les réactifs suivants ont été utilisés :

- Test P : *para*-phénylènediamine (1% de *p*-phénylènediamine dans une solution de thiosulfate de sodium aqueuse (10%)).
- Test K : potasse (solution de KOH à 10% dans de l'eau).
- Test C : hypochlorite de sodium (solution de NaOCl, eau de javel commerciale).
- Test KC : solution K et C appliquées successivement.

### 2.2. Systèmes de broyage

Trois systèmes de broyage ont été testés lors de cette étude : broyage au mixeur, broyage au mortier et un broyeur à boule.

#### 2.2.1. Broyage au mixeur

Les lichens ont été pulvérisés à l'aide du mixeur Brawn multimix MX32 pendant 5 min à puissance maximale (III).

#### 2.2.2. Broyage au mortier

Les lichens ont été broyés manuellement à l'aide de mortiers classiques en porcelaine jusqu'à l'obtention d'une poudre la plus fine possible.

#### 2.2.3. Broyeurs planétaires à boules (Campus Beaulieu, Rennes)

Les lichens préalablement broyés au mixeur (cf. 4.2.1.) ont été broyés à l'aide d'un broyeur à boules Retsch®, PM100. Le bol (3.8 kg à vide) et les boules utilisés sont en corindon (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> polymorphe). 10 boules de diamètres différents ont été utilisées : 5 petites de diamètre 10 mm, 3 moyennes de diamètre 20 mm et 2 grosses de diamètre 30 mm. La rotation a été fixée à 500 tours/min, 1 min dans chaque sens et 5 sec de pause entre les deux sens et ainsi de suite durant la totalité du temps de broyage (20 min pour *R. phycopsis* et 20 min suivie d'une homogénéisation et d'un

remplacement des boules sur le dessus avant de réaliser à nouveau un broyage de 10 min pour *R. fuciformis*).

## 2.3. Extraction des lichens

### 2.3.1. Extractions en parallèles

Les extractions en parallèles ont été effectuées à l'aide d'un robot semi-automatique Heidolph Synthesis 1.

200 mg de lichens broyés ont été placés dans des tubes à essais. L'extraction a été réalisée successivement par différents solvants de polarité croissante (ratio solide/liquide de 2/15, 2/30 ou 2/60) : cyclohexane, diéther éthylique (EE), acétone et méthanol (MeOH) pendant 3 fois 30 min. L'agitation de l'ensemble des tubes a été fixée à 700 rpm/min. Le chauffage de chaque zone (4 zones indépendantes) a été réglé en fonction de la température d'ébullition du solvant considéré : 71°C pour le cyclohexane, 35°C pour le diéther éthylique (EE), 56°C pour l'acétone et 65°C pour le MeOH. Les extraits obtenus ont été filtrés à 0.45 µm à l'aide d'une seringue.

### 2.3.2. Extractions sous reflux

100 g (*R. fuciformis*) ou 20 g (*R. phycopsis*) de poudre de lichen ont été placés dans un ballon de 2 L. L'extraction a été réalisée successivement par différents solvants de polarité croissante en respectant une proportion solide/liquide de 2/60 : cyclohexane, diéther éthylique (EE), acétone et méthanol (MeOH) pendant 3 fois 1 heure. Les extraits obtenus ont été filtrés à 0.45 µm sous vide (système Büchner).

## 2.4. Analyses des extraits

Au cours de cette partie, différentes techniques chromatographiques : analytiques et séparatrices ont été utilisées ainsi que des méthodes de purification. L'ensemble des informations nécessaires et relatives à chacune des méthodes sont décrites ci-après.

### 2.4.1. Techniques analytiques

#### 2.4.1.1. Chromatographies sur couche mince (CCM)

Les dépôts en CCM ont été réalisés à l'aide d'un déposeur automatique CAMAG®. Les différents extraits analysés ont été déposés à une concentration (5 mg/mL) et un volume (16 µL) identiques. L'ensemble des extraits ont été solubilisés dans du THF. Les plaques ont ensuite été mises à migrer principalement dans deux systèmes de solvants : CHCl<sub>3</sub>/MeOH (5/1) (polaire) et EP/EE/CH<sub>3</sub>COOH (5/5/0.2) (apolaire), visualisées sous UV (254 nm, 312 nm et 365 nm) puis révélées soit à l'ANS, à la ninhydrine ou au thymol sulfurique.

### 2.4.1.2. LC-ESI-MS/MS

Pour l'analyse des extraits par LC-ESI-MS/MS, deux gradients ont été utilisés : celui décrit dans la publication Parrot et *al.*, (2013)<sup>137</sup> pour *Roccella* et celui de la publication de Parrot et *al.*, (2014)<sup>87</sup> pour les cyanolichens (**Tableaux 37 et 38**). L'optimisation des paramètres de masse a été effectuée en mode infusion sur l'érythrine (composé présent chez les deux espèces du genre *Roccella* étudiées) et sur la mycosporine sérinol (composé décrit par Roullier et *al.*, (2011) dans *Lichina pygmaea* et *L. confinis*). Ainsi, les paramètres de masse (source ESI) sont les suivants : voltage du spray 4.7 KV, gaz principal : azote, 60 unité arbitraire, gaz auxiliaire 5 unité arbitraire, température du capillaire 220 °C et voltage du capillaire 15 V pour les espèces du genre *Roccella*. Pour les cyanolichens, les paramètres de masses sont : voltage du spray 4.5 KV, gaz principal : azote, 67 unité arbitraire, gaz auxiliaire 5 unité arbitraire, température du capillaire 240 °C and voltage du capillaire 45 V. Le mode d'ionisation choisi est le mode négatif pour le genre *Roccella* et le mode positif pour les cyanolichens vis-à-vis des structures chimiques décrites.

**Tableau 37** : Conditions d'élution utilisées pour les lichens à algues vertes (*Roccella fuciformis* & *R. phycopsis*)<sup>137</sup>

Tps (min)	0	20	25	30	33	48
% H <sub>2</sub> O	80	20	0	0	80	80
% ACN	20	80	100	100	20	20

**Tableau 38** : Conditions d'élution utilisées pour les cyanolichens<sup>87</sup>

Tps (min)	0	1	21	24	25	40
% H <sub>2</sub> O	95	95	5	5	95	95
% ACN	5	5	95	95	5	5

### 2.4.1.3. DART-MS (direct analyses real time)

Les extraits ont été analysés sur un spectromètre de masse de type Jeol Accu ToF instrument (Jeol, USA, Peabody, MA) équipé d'une source DART (ionSense, Inc, Danvers, MA) de l'institut d'électronique et de télécommunication de Rennes (IETR, UMR CNRS 6164, Pr. D. Rondeau) par Pierre LePogam (doctorant). Les paramètres d'analyse ont été fixés comme suit : débit d'hélium (4 mL/min), température (250 °C), énergie de collision (19.8 eV) voltage de nébulisation (3500 V), électrodes de charge (150 V) et électrode grillagée (250 V). Les échantillons ont été analysés en mode d'ionisation positif ([M+H]<sup>+</sup> *m/z*) et traités à l'aide du logiciel Mass Center Main 1.3.

<sup>137</sup>Parrot, D., Jan, S., Baert, N., Guyot, S., and Tomasi, S. (2013) *Phytochemistry* 89, 114–124.

## 2.4.2. Techniques séparatives

### 2.4.2.1. Chromatographie sur couche mince préparative

Afin d'isoler et de séparer certains métabolites spécifiques minoritaires, des CCM préparatives avec indicateur de fluorescence ont été utilisées (DC-Fertilatten SIL G-25/UV<sub>254+366</sub>, Macherey Nage, Allemagne). Cette technique peut être mise en place lorsque des conditions d'élution sont favorables à leur séparation. Selon les cas, différents systèmes de solvants ont été utilisés :

- Toluène/AcOEt/HCOOH (70/25/5)
- CHCl<sub>3</sub>/MeOH (5/1)

Après migration, les plaques sont mises à sécher sous hotte afin d'éliminer complètement les solvants. Par la suite, elles sont visualisées sous UV dans le but de repérer le ou les composés souhaités. Cette technique (comme d'autres) présente des avantages (technique rapide et des faibles quantités peuvent être utilisées ...) mais également des inconvénients, notamment pour l'isolement de métabolites non aromatiques et non visualisables à l'aide de révélateurs chimiques.

Les zones désirées ont été ensuite grattées et une désorption à l'aide d'un solvant permettant leur solubilisation a été effectuée. Dans le cas présent, le THF a été utilisé. L'extrait ainsi obtenu [solvant + silice] a été filtré sur coton afin d'éliminer la silice et les extraits ont été évaporés à sec.

### 2.4.2.2. Chromatographie de type flash

Afin de séparer et d'isoler les métabolites présents dans l'extrait à l'éther diéthylique de *R. fuciformis* et l'extrait à l'acétone de *R. phycopsis*, cette technique a été mise en place. Pour cela, la phase mobile est constituée de deux solutions :

- A : DCM/CH<sub>3</sub>COOH, 98/2
- B : AcOEt

Le gradient consiste en une augmentation de la polarité par l'acétate d'éthyle : 0 à 20 min (100% A), 20-40 min (80% A), 40-50 min (80 % de A, pallier), 50-70 min (60% de A), 70-80 min (60% A, pallier), 80-100 min (40% A), 100-110 min (40% A, pallier), 110-130 min (20% A), 130-140 min (20% A, pallier) et de 140 à 160 min (0% A).

Un dépôt solide de la fraction considérée a été préalablement dissous dans du THF et mélangé à du sable de fontainebleau. Une fois que l'ensemble [fraction (dans THF) + sable] est évaporé et séché sous azote, le dépôt a été effectué et l'élution a pu commencer. L'éluat a été récolté par fractions de 10 mL.

### 2.4.3. Techniques de purification

#### 2.4.3.1. Recristallisation

Cette technique consiste à solubiliser le composé souhaité dans un solvant dans lequel il est soluble à chaud et de le laisser refroidir afin de cristalliser lentement le composé et d'éliminer les impuretés restées dissoutes.

Dans un but de purification des composés isolés, les composés ont été soumis à une recristallisation par différents solvants :

- MeOH : méso-érythritol et acétylportentol
- AcOEt/EP (2 :1) : érythrine
- CH<sub>3</sub>COOH puis lavage par le cyclohexane (azéotrope de l'acide acétique) : acide roccellique

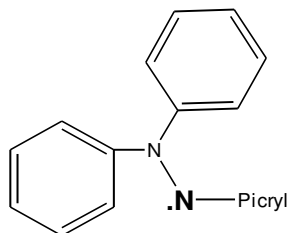
## 2.5. Activités biologiques

Les tests décrits ci-dessous ont été réalisés au sein du laboratoire par Isabelle Rouaud.

### 2.5.1. Test antioxydant : DPPH

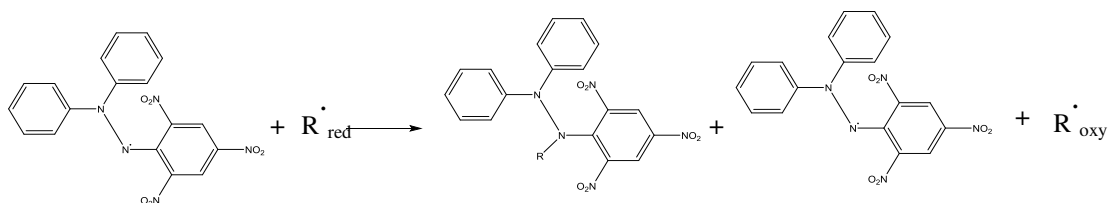
#### 2.5.1.1. Principe

Le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) (**Figure 110**) est un radical stable et sa solution dans le méthanol est de couleur violette.



**Figure 113 : Structure du DPPH**

En présence d'un composé portant un hydrogène labile, le DPPH a la capacité de le fixer et il est alors réduit selon l'équation ci-dessous.



Le but de l'expérience a consisté à apprécier la concentration en DPPH restant après l'ajout de la substance à tester. Cela correspond à une mesure par spectrofluorimétrie à 540 nm afin de déterminer la diminution de la coloration violette et donc le pouvoir antiradicalaire du composé testé.

Ainsi, plus la substance est dite antiradicalaire (c'est à dire portant des hydrogènes labiles), plus le DPPH va disparaître et plus la coloration violette va diminuer et plus le pouvoir antiradicalaire (exprimé en pourcentage d'inhibition) va être important.

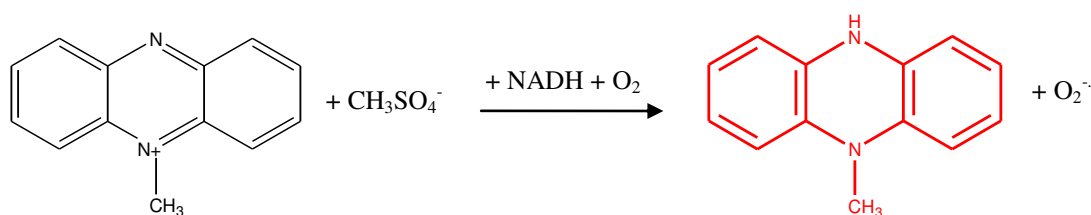
### 2.5.1.2. Mode opératoire

Les substances à tester ont été préparées à une concentration de 30 mM et des dilutions successives de 1/3 en 1/3 ont été effectuées jusqu'à une concentration de 1.11 mM (soit une concentration de 3000  $\mu$ M dans les puits). Par une mesure d'absorbance (540 nm), des courbes de tendance pour les composés présentant une activité ont pu être tracées et la  $CE_{50}$  (concentration correspondant à 50% de transformation du DPPH en DPPH réduit par la molécule à tester) déterminées. Les valeurs obtenues ont été ensuite comparées aux molécules témoin : quercétine et acide gallique

## 2.5.2. Test de l'anion superoxyde

### 2.5.2.1. Principe

La phénazine méthylsulfate en présence de NADH et en condition aérobie produit des anions superoxydes dont la formation est appréciée par un colorant le chlorure de nitrobleu tetrazolium (NBT), selon la réaction suivante (**Figure 111**).



**Figure 114 : Réaction du test anti-oxydant de piégeage de l'anion superoxyde**

Le NBT peut piéger sélectivement les ions  $O_2^{\cdot -}$ . Lorsqu'il est sous forme de piège, il se retrouve alors sous forme de sel de formazan insoluble dans l'eau.

Le but est d'apprécier la concentration en sels de formazan absorbant à 540 nm après l'ajout de PMS et du NADH réduit en présence et en absence d'une substance à tester. Cette coloration est proportionnelle à la quantité d'anions  $O_2^{\cdot -}$ . Ainsi, plus la coloration sera faible, plus le composé testé présentera un pouvoir antioxydant fort.

#### 2.5.2.2. Mode opératoire

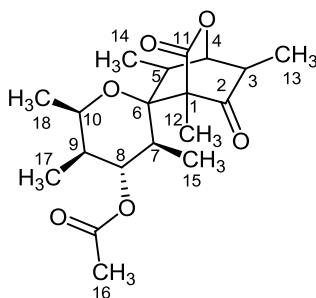
Les substances à tester ont été préparées à une concentration de 7 mM et des dilutions successives au 1/3 ou au 1/2 ont été effectuées jusqu'à une concentration de 875  $\mu$ M (soit une concentration de 43.75  $\mu$ M dans les puits). Par une mesure d'absorbance (560 nm), des courbes de tendance pour les composés présentant une activité ont pu être tracées et les  $CI_{50}$  déterminées. Les valeurs obtenues ont ensuite été comparées aux molécules témoin : quercétine et vitamine C.

### 2.6. Descriptif des métabolites isolés de *Roccella fuciformis* & *Roccella phycopsis*

Les caractéristiques analytiques de l'ensemble des métabolites isolés de *Roccella fuciformis* et *Roccella phycopsis* sont détaillées ci-dessous.



## 2.6.1. (+)-Acétylportentol (RF1)



**Sources :** *Roccella fuciformis*

**Aspect :** Cristaux ou poudre blanche

**Isolement :** De *R. fuciformis* par une extraction au cyclohexane. Recristalisation du précipité se formant par évaporation lente du solvant par du MeOH.

**Quantité :** 466 mg (0.5%)

**Formule brute :**  $C_{19}H_{28}O_6$  (MM :  $352 \text{ g.mol}^{-1}$ )

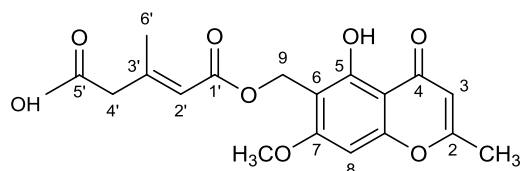
**HRESIMS :**  $m/z$   $[M+Na]^+$  375.17836

**$[\alpha_D]$  à 25 °C :**  $+40.3 \text{ dm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-3}$ ;  $c = 1$ , MeOH

**RMN :** Déplacements chimiques RMN (ppm) obtenus lors de l'étude ( $CDCl_3$ , 500 MHz)

Position	$\delta_c$	$\delta_H$ (J en Hz), (allure)
1	67.7	-
2	207.6	-
3	45.9	2.33 (7.5 ; 6.9) (qd)
4	83.9	4.42 (7.2) (s)
5	37.5	2.42 (6.6) (ql)
6	80.3	-
7	38.3	2.01 (7.1 ; 2.5) (qd)
8	75.1	5.06 (2.5) (tapp.)
9	40.2	1.43 (m)
10	71.0	3.79 (m)
11	168.6	-
12	8.6	1.34 (s)
13	14.2	1.23 (7.1) (d)
14	14.8	1.54 (7.1) (d)
15	13.7	0.75 (7.1) (d)
16	20.7	2.12 (s)
17	15.2	0.75 (7.1) (d)
18	19.6	1.11 (6.0) (d)
-COO	170.3	-

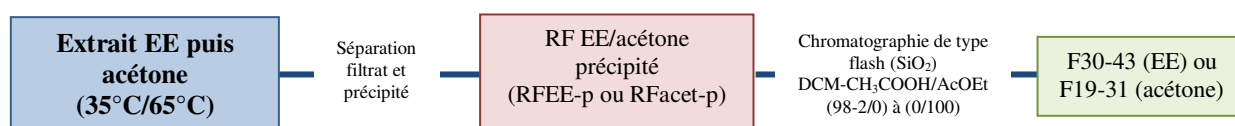
## 2.6.2. Acide léprarique (RF2)



**Sources :** *Rocella fuciformis*

**Aspect :** Poudre blanche

**Isolement :**



**Quantité :** 1.07 g (1.1%)

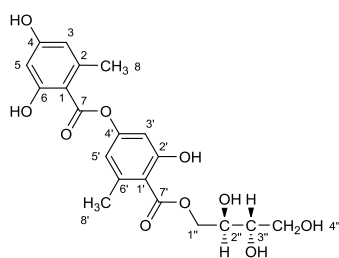
**Formule brute :**  $C_{18}H_{18}O_8$  (MM :  $362 \text{ g.mol}^{-1}$ )

**HRESIMS :**  $m/z$   $[M+Na]^+$  385.08994

**RMN :** Déplacements chimiques RMN (ppm) obtenus lors de l'étude ( $CDCl_3$ , 300 MHz)

Acide léprarique (RF2)		
Position	$\delta_C$	$\delta_H$ (J en Hz) (allure)
<b>1</b>	18.9	2.26 (1.1) (d)
<b>2</b>	166.1	-
<b>3</b>	106.7	5.80 (1.1) (q)
<b>4</b>	182.4	-
<b>4a</b>	105.0	-
<b>5</b>	160.8	-
<b>6</b>	109.1	-
<b>7</b>	164.1	-
<b>8</b>	89.6	6.37 (s)
<b>8a</b>	158.5	-
<b>9</b>	54.3	5.25 (s)
<b>OMe</b>	56.1	3.89 (s)
<b>1'</b>	166.8	-
<b>2'</b>	120.1	6.07 (sl)
<b>3'</b>	149.9	-
<b>4'</b>	45.2	3.14 (s)
<b>5'</b>	174.6	-
<b>6'</b>	20.5	2.36 (s)
<b>OH</b>	-	13.02 (s)

## 2.6.3. (+)-érythrine (RF3 et RP3)

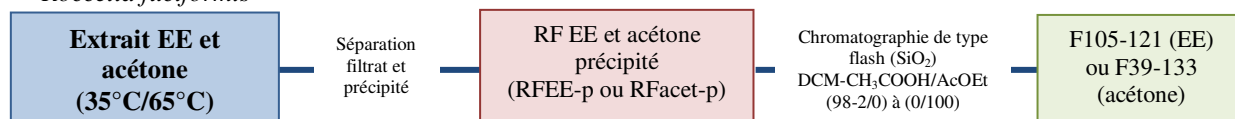


**Sources :** *Roccella fuciformis* et *Roccella phycopsis*

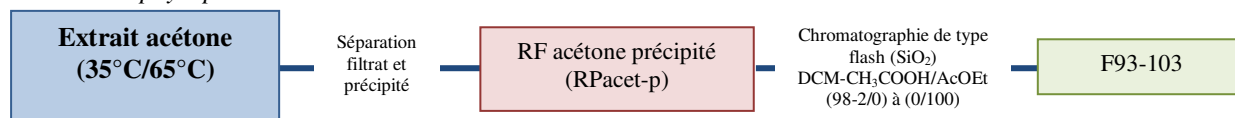
**Aspect :** Poudre blanche

**Isolement :**

*Roccella fuciformis*



*Roccella phycopsis*



Les fractions récupérées sont soumises à une recristallisation dans un mélange AcOEt/EP (2/1)

**Quantité :** 256 mg (0.2% pour *R. fuciformis* et 0.3% pour *R. phycopsis*)

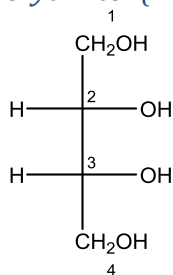
**Formule brute :** C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>O<sub>10</sub> (MM : 421 g.mol<sup>-1</sup>)

**HRESIMS :** *m/z* [M+Na]<sup>+</sup> 445.11107

**[α]<sub>D</sub> à 25 °C :** +3 dm<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup>.cm<sup>-3</sup>; c = 1, DMSO

(+) -Erythrine (RF3)		
Position	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub> (J en Hz) (allure)
1	107.4	-
2	140.4	-
3	100.7	6.22 (2.3) (d)
4	161.3	-
5	110.0	6.60 (3.6) (d)
6	160.2	-
7	167.4	-
8	21.5	2.29 (s)
1'	114.5	-
2'	152.0	-
3'	108.6	6.60 (3.6) (d)
4'	156.8	-
5'	118.5	6.22 (2.3) (d)
6'	138.7	-
7'	168.1	-
8'	20.1	2.34 (s)
1''	67.3	3.54 (m)
2''	69.5	4.20 (m)
3''	72.8	3.68 (sl)
4''	63.5	4.34 (sl)
2''-OH	-	4.97 (5.4) (d)
3''-OH	-	4.74 (sl)
4-OH	-	10.32 (s)
6-OH	-	10.36 (s)
6'-OH	-	10.03 (s)

## 2.6.4. Meso-érythritol (RF4 et RP4)



**Sources** : *Rocella fuciformis* et *Rocella phycopsis*

**Aspect** : Cristaux ou poudre blanche

**Isolement** : Extraction de *R. fuciformis* et de *Rocella phycopsis* par une extraction au MeOH. Recristallisation du précipité ce formant par évaporation lente du solvant par du MeOH.

**Quantité** : 192 mg (0.2% pour *R. fuciformis* et 0.025% pour *R. phycopsis*)

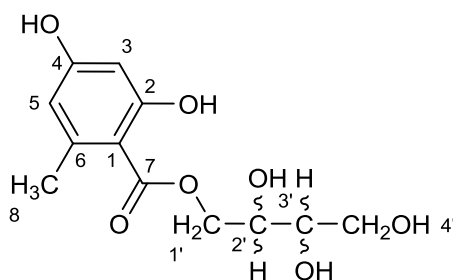
**Formule brute** :  $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_4$  (MM :  $122 \text{ g.mol}^{-1}$ )

**HRESIMS** :  $m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  145.04768

**RMN** : Déplacements chimiques RMN (ppm) obtenus lors de l'étude (DMSO- $d_6$ , 500 MHz)

Position	Nb de Protons	$\delta_c$	$\delta_H$ (ppm) ( J en Hz) (allure)
<u>CH</u> <sub>2</sub> OH	4H	72.6	4.33 (m)
CH- <u>OH</u>	2H	63.4	3.51-3.56 (m)
<u>OH</u>	2H	-	4.47 (m)

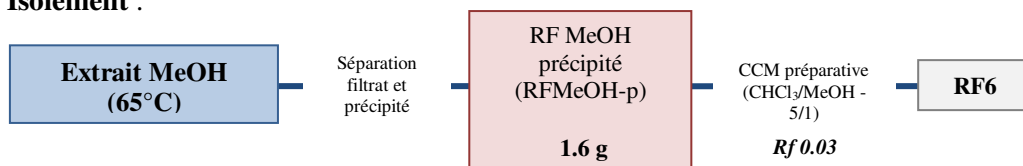
## 2.6.5. Montagnétol (RF6)



**Sources :** *Roccella fuciformis*

**Aspect :** Poudre blanche

**Isolement :**



**Quantité :** 3 mg (0.003%)

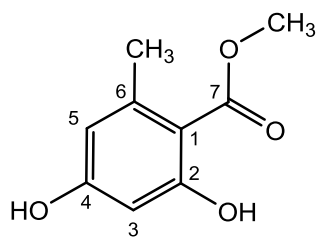
**Formule brute :**  $C_{12}H_{16}O_7$  (MM :  $272 \text{ g.mol}^{-1}$ )

**HRESIMS :**  $m/z$   $[M+Na]^+$  295.07937

**RMN :** Déplacements chimiques RMN (ppm) obtenus lors de l'étude  $((CD_3)_2CO$ , 300 MHz)

Montagnétol (RF6)	
Position	$\delta_H$ (J en Hz) (allure)
1	-
2-OH	9.09 (s)
3	6.25 (2.5) (d)
4-OH	11.60 (s)
5	6.30 (2.5 ; 0.7) (qd)
6	-
7	-
8	2.55 (s)
1'	3.71 (m)
2'	4.00 (m)
3'	3.80 (m)
4'	4.29 (5.3) (d)
2'-OH	4.61 (11.5 ; 2.8) (dd)
3'-OH	4.61 (11.5 ; 6.4) (dd)

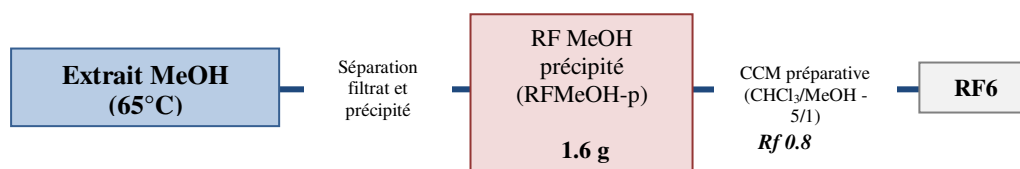
## 2.6.6. Orsellinate de méthyle (RF7)



**Sources :** *Rocella fuciformis*

**Aspect :** Poudre blanche

**Isolement :**



**Quantité :** 3 mg (0.003%)

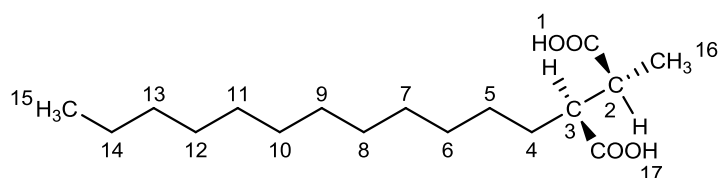
**Formule brute :**  $C_9H_{10}O_4$  (MM :  $182 \text{ g.mol}^{-1}$ )

**HRESIMS :**  $m/z$   $[M+Na]^+$  205.04768

**RMN :** Déplacements chimiques RMN (ppm) obtenus lors de l'étude  $((CD_3)CO, 300 \text{ MHz})$

Orsellinate de méthyle (RF7)	
Position	$\delta_H$ (allure)
1-COOCH <sub>3</sub>	3.92 (s)
2-OH	9.17 (sl)
3	6.24 (s)
4-OH	11.62 (s)
5	6.29 (s)
6-CH <sub>3</sub>	2.46 (s)

## 2.6.7. (+)- Acide roccellique (RP1)



**Sources** : *Roccella phycopsis*

**Aspect** : Poudre blanche

**Isolement** : Extraction de *R. phycopsis* par du diether éthylique. Recristallisation du précipité se formant par évaporation lente du solvant par de l'acide acétique et élimination de ce dernier par des lavages au cyclohexane.

**Quantité** : 250 mg (1.3%)

**Formule brute** :  $C_{17}H_{32}O_4$  (MM :  $300 \text{ g.mol}^{-1}$ )

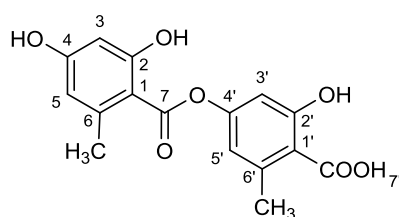
**HRESIMS** :  $m/z$   $[M+Na]^+$  323.21983

$[\alpha_D]$  à  $25^\circ\text{C}$  :  $+11 \text{ dm}^{-1}.\text{g}^{-1}.\text{cm}^{-3}$ ;  $c = 1$ , THF

**RMN** : Déplacements chimiques RMN (ppm) obtenus lors de l'étude (MeOD, 500 MHz)

Position	$\delta_c$	$\delta_H$ (J en Hz) (allure)
1-COOH	175.45	-
2	42.68	1.43 (11.6) (d)
3-COOH	176.20	-
3	49.27	1.60 (s)
4-14	23.40-32.71	1.23-1.33 (m)
15	14.43	0.90 (6.8) (t)
16	15.82	1.17 (6.1) (d)

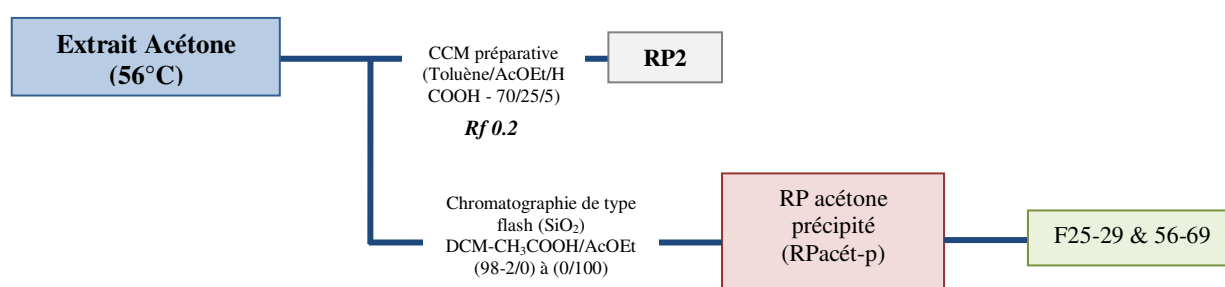
## 2.6.8. Acide lécanorique (RP2)



**Sources :** *Roccella fuciformis*

**Aspect :** cristaux ou poudre blanche

**Isolement :**



**Quantité :** 3 mg (0.02%)

**Formule brute :**  $C_{16}H_{14}O_7$  (MM : 318 g.mol<sup>-1</sup>)

**HRESIMS :**  $[M-H]^-$   $m/z$  317.06613

**RMN :** Déplacements chimiques RMN (ppm) obtenus lors de l'étude ((CD<sub>3</sub>)CO, 300 MHz)

Position	$\delta_H$ (J en Hz) (allure)
2-OH	-
3	6.22 (2.2) (d)
4-OH	8.96
5	6.47 (2.2) (d)
6-CH <sub>3</sub>	2.19 (s)
2'-OH	-
3'	6.29 (1.8) (d)
5'	6.65 (1.8) (d)
6'-CH <sub>3</sub>	2.40 (s)
7'-COOH	12.12 (s)



### 3. Matériels & Méthodes de la Partie 4

#### 3.1. Isolement des communautés bactériennes

Après un nettoyage rapide par de l'eau stérile sur les lieux de récoltes des lichens afin d'éliminer les bactéries environnementales non associées, les lichens ont été par la suite congelés à -80 °C jusqu'à utilisation.

##### *3.1.1. Approche dépendante de la culture*

##### *3.1.1.1. Protocole utilisé pour **Roccella sp.** & **Lichina sp.** (Laboratoire LBBM, Banyuls/Mer, France, Pr M. Suzuki)*

Les lichens ont été prélevés avec une spatule nettoyée à l'eau de Javel et la masse de chaque lichen utilisé est pesé. 20 mL d'eau de mer (SOLA) ultrafiltrée et bouillie au micro-onde ont été ajoutés. Les tubes Falcons ont été agités par vortex pendant 1 min. 3 lavages successifs avec 20 mL d'eau de mer ont été ainsi réalisés. A chaque fois, après décantation si besoin, le surnageant a été prélevé et placé dans un tube Falcon propre jusqu'à obtenir 30-35 mL de liquide. Le surplus des nettoyages a été jeté.

Les morceaux de lichen ont été ensuite placés dans un blender avec 20 mL d'eau de mer stérile. Le lichen a été broyé pendant 15 secondes à la vitesse maximale. Puis, 10 mL d'eau de mer sont ajoutés et un nouveau broyage de 10 secondes a été réalisé. Les morceaux projetés sur les parois ont été remis en suspension à l'aide d'une pipette. Un troisième broyage de 10 secondes a été réalisé. Les morceaux n'étant pas suffisamment fins, 10 billes en verre stériles de 3 mm de diamètre ont été ajoutées au broyat dans un tube Falcon et le tout a été vortexé pendant 1 minute.

Après étalement, aux dilutions désirées (tableau 11) dans de l'eau de mer stérile, 10% v/v de glycérol 100% ont été ajoutés aux jus pour une conservation à -80°C.

2 milieux de culture ont été utilisés (**Tableau 39**) :

- **milieu 1** : MA (Marine Agar – salé) + cycloheximide (75 mg pour 800 mL de milieu) + acide nalidixique (15 mg pour 800 mL de milieu).
- **milieu 2** : AIA (actinomycete isolation agar – non salé) + 5 mL de glycérol 100% + acide nalidixique (15 mg pour 800 mL de milieu) + cycloheximide (75 mg pour 800 mL de milieu).

**Tableau 39** : Récapitulatif du protocole d'isolement des communautés bactériennes cultivables associées à *L. confinis* (LC), *L. pygmaea* (LP) et *R. fuciformis* (RF)

Milieux	Jus de nettoyage		Broyat	
	MA	AIA	MA	AIA
<i>L. confinis</i> (1.81 g)	En triplicat 3 dilutions : N ; N-1 ; N-2	En triplicat 3 dilutions : N ; N-1 ; N-2	En triplicat 3 dilutions : N ; N-1 ; N-2	En triplicat 3 dilutions : N ; N-1 ; N-2
<i>L. pygmaea</i> (1.91 g)	En triplicat 3 dilutions : N ; N-1 ; N-2	En triplicat 3 dilutions : N ; N-1 ; N-2	En triplicat 3 dilutions : N ; N-1 ; N-2	En triplicat 3 dilutions : N ; N-1 ; N-2
<i>R. fuciformis</i> (1.90 g)	En triplicat 4 dilutions : N ; N-1 ; N-2 ; N-3	En triplicat 4 dilutions : N ; N-1 ; N-2 ; N-3	En triplicat 4 dilutions : N ; N-1 ; N-2 ; N-3	En triplicat 4 dilutions : N ; N-1 ; N-2 ; N-3

Après le développement des colonies à 25°C, chaque colonie morphologiquement différente, jusqu'à un maximum de 3 colonies, a été repiquée et étalée sur un même nouveau milieu de culture jusqu'à l'obtention de colonies pures.

### 3.1.1.2. Protocole utilisé pour *Collema* sp. (Institut für Pflanzenwissenschaften, Karl-Franzens Universität, Graz, Autriche, Pr. M. Grube)

Les lichens ont été prélevés avec une spatule nettoyée à l'EtOH 70% et flambée, et la masse de chaque lichen utilisé a été pesé. 10 mL d'une solution de NaCl 0.85% / peptone issus de caséine 1% ont été ajoutés. Le tube Falcon a été vortexé pendant 1 min. 3 lavages successifs avec 10 mL de cette solution ont ainsi été réalisés. A chaque fois, après décantation si besoin, le surnageant a été prélevé et placé dans un tube Falcon propre jusqu'à obtenir 30-35 mL de liquide.

Les morceaux de lichen sont ensuite coupés en petits morceaux à l'aide d'un scalpel nettoyé à l'EtOH 70% et flambé puis 10 mL de la solution ainsi que 14 billes en verres stériles de 3 mm y ont été ajoutés. Le lichen a été vortexé pendant 1 minute. 3 lavages successifs avec 10 mL de cette solution ont ainsi été réalisés jusqu'à obtenir 30-35 mL.

Après étalement, aux dilutions désirées (**Tableau 40**) dans de l'eau stérile, 10% v/v de glycérol 100% sont ajoutés aux jus pour une conservation à -80°C.

1 milieu de culture a été utilisé (**Tableau 40**) :

- **milieu** : ISP2 (Yeast extract-malt extract agar) + Amphotéricine B (1 mL/L) + acide nalixidique (75 mg pour 800 mL de milieu)

**Tableau 40** : Récapitulatif du protocole utilisé pour l'isolement des communautés bactériennes cultivables associées à *C. auriforme*

Milieux	Jus de nettoyage	Broyat
	ISP2	ISP2
<i>C. auriforme</i> (1.17 g)	En triplicata 4 dilutions : N ; N-1 ; N-2 ; N-3	En triplicata 4 dilutions : N ; N-1 ; N-2 ; N-3

Après le développement des colonies à  $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , chaque colonie morphologiquement différente, jusqu'à un maximum de 3 colonies, a été repiquée et étalée sur un même nouveau milieu de culture jusqu'à l'obtention de colonies pures.

### 3.1.1.3. Extraction - Purification du gène de ARNr 16S

Deux protocoles ont été utilisés :

- Banyuls sur Mer (LBBM, Plateforme Bio2Mar France)

Après l'extraction de l'ADN des colonies pures à l'aide du Kit Promega® et la réalisation du protocole décrit (Isolation of Genomic DNA from Gram Positif and Gram Negatif Bacteria), l'amplification de l'ADN a été réalisée selon les conditions suivantes (**Tableau 41**) :

**Tableau 41 : Amorces et conditions PCR utilisées pour l'ADNr 16S**

Amorces					
Amorce (sens): 27F mod - 5'AGRGTTCGATCMTGGCTCAG 3'					
Amorce (inverse): 1492r mod - 5'TACGGYTACCTTGTTAYGACTT 3'					
Composition MIX		PCR conditions (Thermocycleur ABI (Applied Biosystems))			
	[ $\mu\text{L}$ ]		Température	Temps	Nombre de cycles
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1				
H <sub>2</sub> O ultrapure	5.75	Dénaturation initiale	94°C	5 min	1
Tampon 10X	1	Dénaturation	94°C	30 sec	35
dNTP mix (20 mM)	0.4	Hybridation	50°C	30 sec	
Amorce 1 (10 $\mu\text{M}$ )	0.4	Extension	72°C	1.30 min	
Amorce 2 (10 $\mu\text{M}$ )	0.4	Extension finale	72°C	10 min	1
Platinum Taq Polymérase (5U/ $\mu\text{L}$ )	0.05	Stockage : 4°C			
Echantillon	1				
Total	10				

Une fois l'amplification finie, un gel de contrôle d'agarose 1% avec addition de bromure d'éthidium (BET) (1  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) a été réalisé. Après une migration de 15 min à 100 Volt, les gels ont été révélés sous UV. Par la suite, les produits PCR ont été nettoyés avec le Kit Agencourt AMPure XP selon leur protocole. 1 ou 2  $\mu\text{L}$  de cette matrice d'ADN (surnageant) a été utilisé pour réaliser la réaction de séquence avec les conditions ci-dessous (**Tableaux 42 et 43**) :

**Tableau 42 : Amorces utilisées pour la réaction de séquence à partir de l'ADNr 16S**

Amorce
Amorce (inverse) : 907r - 5'AGRGTTCGATCMTGGCTCAG 3'

**Tableau 43 : Conditions PCR utilisées pour la réaction de séquence à partir de l'ADNr 16S**

Composition MIX		PCR conditions (Thermocycleur AB2700 (Applied Biosystems))			
	[μl]				
H <sub>2</sub> O ultrapure	5.75		Température	Temps [min]	Nombre de cycles
Tampon BDT 5X	1.75	Dénaturation	95°C	10 sec	40
Big Dye Terminator (V3.1)	0.5	Hybridation	50°C	5 sec	
Amorce (3.2 μM)	1	Elongation	50°C	2.30	
Echantillon	1 ou 2	Stockage : 4°C			
Total	10				

Les produits obtenus après la réaction de séquençage ont ensuite été nettoyés avec le Kit Agencourt CleanSeq selon leur protocole.

- Graz (Institut für Pflanzenwissenschaften, Karl-Franzens-Universität, Autriche)

Après l'extraction de l'ADN des colonies pures à l'aide du Kit Promega® et la réalisation du protocole décrit (Isolation of Genomic DNA from Gram Positif and Gram Negatif Bacteria), l'amplification de l'ADN a été réalisée selon les conditions suivantes et en utilisant les billes illustra™ puReTaq Ready-To-Go PCR de GE Healthcare® (**Tableau 44**) :

**Tableau 44 : Amorces et conditions PCR utilisées pour l'ADNr 16S**

Amorces					
Amorce (sens): 27F mod - 5'AGRGTTTGATCMTGGCTCAG 3'					
Amorce (inverse): 1492r mod - 5'TACGGYTACCTTGTTAYGACTT 3'					
Composition MIX		PCR conditions (Thermocycleur)			
	[ $\mu$ l]				
MgCl <sub>2</sub>	0		Température	Temps	Nombre de cycles
H <sub>2</sub> O ultrapure	15	Dénaturation initiale	94°C	5 min	1
Buffer Taq (GE-H.)	0	Dénaturation	94°C	30 sec	35
dNTP mix (2.5 mM)	0	Hybridation	56.4°C	30 sec	
Amorce 1 (10 pmol/ $\mu$ L)	1.5	Extension	72°C	1.30 min	
Amorce 2 (10 pmol/ $\mu$ L)	1.5	Extension finale	72°C	10 min	1
Taq Polymérase (GE-H.)	0	Stockage : 4°C			
Echantillon	2				
Total	20				

Une fois l'amplification finie, un gel de contrôle d'agarose 1% avec addition de RedGel (10.000X dans H<sub>2</sub>O) a été réalisé. Après une migration de 50 min à 70 Volt, les gels ont été révélés sous UV. Par la suite, les produits PCR ont été nettoyés avec le Kit NucleiSpin Gel and PCR Clean Up de Macherey-nagel® et selon leur protocole.

### 3.1.1.4. Cryoconservation

Les souches bactériennes isolées de ces quatre lichens (*Lichina confinis*, *L. pygmaea*, *Roccella fuciformis* et *Collema auriforme*) ont été conservées par cryogénisation. Une solution de 500 µL ou de 950 µL de suspension bactérienne d'une pré-culture de 72h dans le milieu de culture adéquate (MB, LB ou ISP2), à laquelle sont ajoutés soit 500 µL d'une solution de glycérol à 70% ou soit 50 µL de DMSO respectivement, sont préparées en duplicata dans des cryotubes stériles (soit 2 cryotubes dans le glycérol 70% et 2 cryotubes dans le DMSO pour chaque souche isolée). Les cryotubes sont par la suite conservés à -80 °C soit dans la souchothèque du laboratoire LBBM de Banyuls/Mer (souches MOLA), soit au laboratoire à Rennes et à l'institut de Biologie Végétale de Graz (Autriche) pour les souches DP.

### 3.1.1.5. Séquençage et analyse des séquences

Le séquençage partiel du gène de l'ARNr 16S (880 paire de base (pb) maximum) des souches bactériennes a été réalisé soit au sein du laboratoire LBBM, plateforme Bio2MAR, UMS 2348 (Banyuls sur Mer, France) sur un séquenceur de type ABI 3130xl genetic Analyser soit pour 20 souches de *Collema auriforme* par la compagnie Macrogen (Amsterdam, Hollande). Les séquences ont été analysées à l'aide du package Staden et l'outil GAP4 et l'identification a été réalisée par comparaison avec la base de données Eztaxon sever (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net>).

Les séquences de tous les isolats ont été soumises à une analyse à l'aide de QIIME v1.5.0.<sup>138</sup> Toutes les séquences ont été groupées en au niveau de l'identité de 98,5% en utilisant l'algorithme uclust usearch 5,2 (<http://drive5.com/usearch/>). Les OTU ont été classés en utilisant la rdp\_classifier et une mise à jour de base de données basée sur la taxonomie Greengenes Octobre 2012 (<http://greengenes.secondgenome.com>). Une table d'OTU compte tenu des combinaisons uniques d'unités d'échantillonnage entre les espèces de lichens, inoculum (homogénat ou l'eau de lavage) et un environnement d'isolation a été créé. Depuis l'ajout de l'étude de l'acide nalidixique sélectionné Actinobacteria, analyse ultérieure a été effectuée uniquement avec les organismes dans ce phylum. Tables et les séquences ont été analysées en utilisant les fichiers de l'OTU scripts shell pour sélectionner Actinobacteria. Les séquences ont été alignées et masqués pour permettre la reconstruction de l'arbre phylogénétique en utilisant les paramètres par défaut QIIME (pynast alignement et arbre fasttree). La mise en œuvre de toutes les séquences de l'arbre a été utilisé pour calculer une matrice de dissemblance unifrac non pondérée qui a finalement été utilisé pour le clustering UPGMA et la visualisation par le logiciel Cytoscape (v.3.1.0).

<sup>138</sup>Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. a, Berg-Lyons, D., Lozupone, C. a, Tumbaugh, P. J., Fierer, N., and Knight, R. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 Suppl 1, 4516–22.

## 3.2. Propriétés biologiques des colonies bactériennes

### 3.2.1. Propriétés antibactériennes : technique de la gélose molle

L'évaluation des propriétés antibactériennes de chaque colonie cultivable isolée a été réalisée par la technique de gélose molle. Les souches bactériennes à tester ont été mises en cultures liquides appropriés (milieu d'isolement en l'occurrence) durant 72 h à 25 °C sous 110 rpm. 3 µL de ces cultures liquides ont été déposés sur le milieu solide et incubés à 25 °C pendant 7 jours. Les cibles bactériennes à tester ont été mises en culture sur milieu LB agar 24 h avant utilisation à 37 °C. Des solutions à un trouble de 2 sur l'échelle de McFarland ont été réalisées dans 5 mL d'eau stérile. Une gélose molle (LB ou Müller Hilton), c'est-à-dire contenant 10 g d'agar par litre de culture a servi d'inoculateur pour les cibles bactériennes. 10 mL de cette gélose molle ont été inoculés par 100 µL de la solution bactérienne à 2 sur l'échelle de McFarland et coulés sur les souches environnementales à tester. Le tout est ensuite mis à incuber pendant 24 h à 37 °C. Les souches présentant des propriétés antibactériennes sont mises en évidence par la présence d'un halo d'inhibition. Les tests ont été réalisés en duplicata soit à Banyuls/Mer par Elodie Desgranges et Cécile Villette (souches MOLA) soit à Rennes par moi-même (Souches *C. auriforme* : DP).

## 3.3. Analyses chimiques des colonies bactériennes

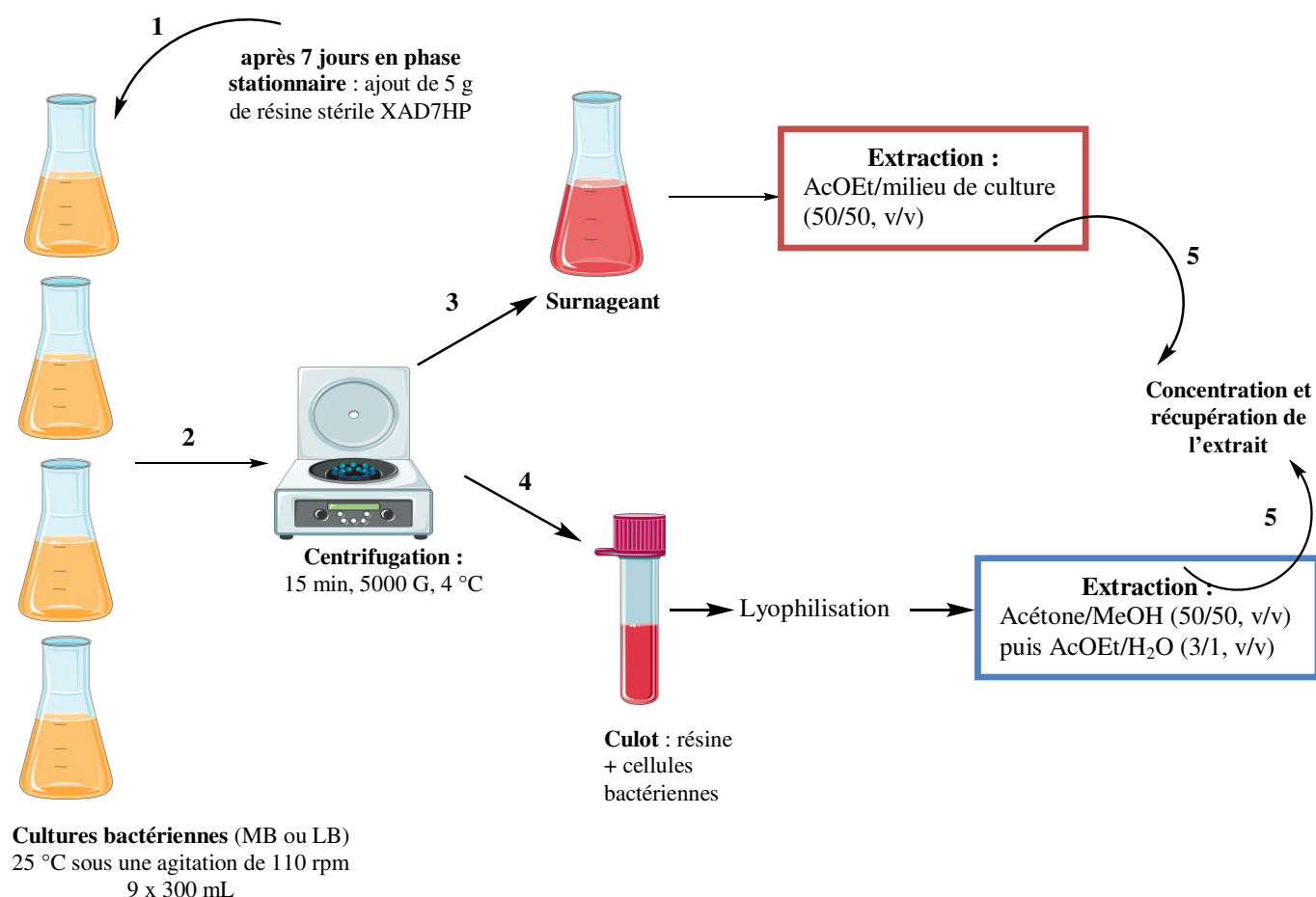
### 3.3.1. Milieux de culture et protocole d'extraction

Toutes les cultures solides et liquides des souches bactériennes ont été réalisées soit dans le milieu marine agar (marine broth, son équivalent liquide) (Difco®) (MA et MB), soit dans le milieu Luria agar (Luria broth, son équivalent liquide) (LB) et soit dans le milieu ISP2 liquide et solide (International *Streptomyces* Project 2). Ces deux derniers milieux ont été préparés de la manière suivante :

- **LB** : 5 g de peptone, 5 g d'extrait de levure, 3 g de NaCl et 15 g d'agar (Sigma Aldrich®).
- **ISP2** : 10 g d'extrait de malt, 10 g d'extrait de levure, 5 g de glucose et 20 g d'agar (Sigma Aldrich®).

Les cultures de MOLA1488 et MOLA1416 sont réalisées en milieux liquides (LB et MB respectivement) dans des flacons de 500 mL. Neuf flasks de 300 mL sont préparés pour chaque série de culture. Une inoculation à 1% à partir d'une pré-culture de 72h est réalisée. L'ensemble est incubé à 25 °C sous une agitation de 110 rpm. La croissance bactérienne est suivie tous les jours par une mesure de la densité optique à 450 nm afin de déterminer le début de la phase stationnaire. Une fois que la phase stationnaire est atteinte, les cultures sont poursuivies pendant 7 jours dans les mêmes conditions. En fin de culture, 5 g de résine XAD7HP (Sigma Aldrich ®) stériles sont ajoutés à chaque

flask et le tout est incubé à 25 °C, sous une agitation de 110 rpm pendant 4h. Ensuite, le tout (cultures bactériennes et résine) est centrifugé à 5000 G pendant 15 min à 4 °C. A l'issue de cette étape, un surnageant et un culot constitué de la résine et des cellules bactériennes sont obtenus. Le surnageant est récupéré et extrait par l'AcOEt (1 :1, v/v par rapport au volume du surnageant). La phase organique est alors concentrée sous vide et sa masse est déterminée. Quant au culot, il est tout d'abord lyophilisé puis extrait 3 fois au moins avec un mélange acétone/MeOH (50/50, v/v). Cet extrait organique est ensuite évaporé sous vide et contre-extrait (3 fois également) avec un mélange AcOEt/H<sub>2</sub>O (2/1, v/v). La phase organique est récupérée, séchée sur sulfate de sodium anhydre, filtrée à 0.45 µm et concentrée à sec. Cet extrait organique constitue l'extrait d'intérêt (**Figure 115**).



**Figure 115** : Schéma récapitulatif du protocole d'extraction des cultures bactériennes

### 3.3.2. Etude chimique de deux souches bactériennes cultivables associées aux lichens

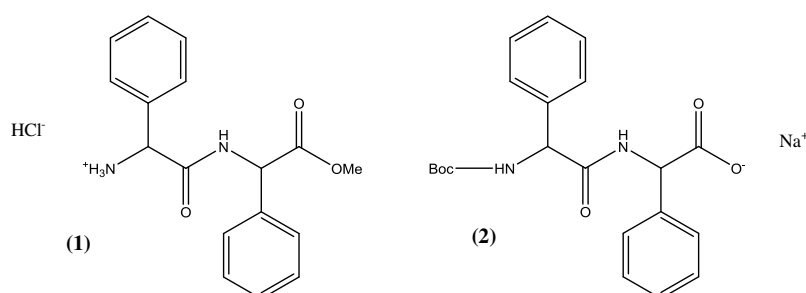
Au cours de cette partie, différentes techniques chromatographiques : analytiques et séparatrices ont été utilisées ainsi que des méthodes de purification. L'ensemble des informations nécessaires et relatives à chacune des méthodes sont décrits ci-dessous.

### 3.3.3. Techniques analytiques

#### 3.3.3.1. CLHP et LC-ESI-MS/MS

Pour l'analyse des extraits par CLHP et par LC-ESI-MS/MS, le gradient décrit **Tableau 45** et la colonne suivante ont été utilisés : Prevail, C18, 5  $\mu$ , 250 x 4.6 mm, GRACE®). Le débit utilisé est de 1 mL/min au niveau de la chromatographie liquide et est de 0.2 mL/min au niveau de la source (mise en place d'un système de « split »). L'optimisation des paramètres de masse a été effectuée en mode infusion sur deux produits synthétisés par Dr. Nicolas Gouault (Université de Rennes 1, UMR CNRS 6226, ISCR, Equipe PNSCM) (**Figure 116**):

- $\text{NH}_3^+$ -Phe-Phe-OMe +  $\text{HCl}^-$  (1)
- N-Boc-Phe-Phe-COO $^-$  +  $\text{Na}^+$  (2)



**Figure 116** : Structures des deux composés synthétisés pour l'optimisation des conditions de masse

Ainsi, les paramètres de masse (source ESI) sont les suivant : voltage du spray 4.7 KV, gaz principal : azote, 60 unité arbitraire, gaz auxiliaire 5 unité arbitraire, température du capillaire 220 °C et voltage du capillaire 15 V. Les deux modes d'ionisation ont été étudiés

**Tableau 45** : Conditions d'élution utilisées

Tps (min)	0	5	7	15	17	25	27	40	41	45
% $\text{H}_2\text{O}$	99	90	90	75	75	50	50	0	99	99
% ACN	1	10	10	25	25	50	50	100	1	1

### 3.3.4. Techniques séparatives

#### 3.3.4.1. Chromatographie sur couche mince préparative

Afin d'isoler et de séparer certains métabolites spécifiques minoritaires, des CCM préparatives avec indicateur de fluorescence ont été utilisées. Selon les cas, différents systèmes de solvants ont été utilisés :

- AcOEt (100%)
- DCM/AcOEt (95/5)
- DCM/AcOEt/MeOH (15/15/3)

Les zones désirées, après migration, ont été ensuite grattées et une désorption à l'aide d'un solvant permettant leur solubilisation a été effectuée. Dans le cas présent, l'AcOEt a été utilisé.



L'extrait ainsi obtenu [solvant + silice] a été filtré sur coton afin d'éliminer la silice et les extraits ont été évaporés à sec.

#### *3.3.4.2. Chromatographie liquide semi-préparative*

Afin de séparer et d'isoler les métabolites présents dans les extraits à l'AcOEt de MOLA1488, cette technique a été mise en place. Les profils chimiques (type Agilent 1220 équipée d'une pompe à gradient binaire et d'un détecteur de type PDA) ont été réalisés sur colonne C18 préparative (Kromasil, C18, 100A, 5  $\mu$ , 250 x 10 mm). La phase mobile est constituée de deux solutions :

- A : H<sub>2</sub>O

- B : ACN

Le gradient consiste en une diminution de la polarité par l'acétonitrile : 0 à 5 min (1 % B), 5-7 min (10% B, pallier), 7-15 min (15 % de B), 15-17 min (15% de B, pallier), 17-25 min (50% B), 25-27 min (50% B, pallier), 27-40 min (100% B), suivit d'un reconditionnement de la colonne à 1% de B durant 6 min.

Des solutions à 100 mg/mL ont été injectées. L'éluat a été récolté par fractions de volume variable selon le chromatogramme UV (280 nm et 441 nm).

#### *3.3.4.3. Chromatographie de type flash*

Afin de séparer et d'isoler les métabolites présents dans les extraits AcOEt de MOLA1488 ou de MOLA1416, cette technique a été mise en place. Pour cela, la phase mobile est constituée de trois solutions :

- A : DCM

- B : AcOEt

- C : MeOH

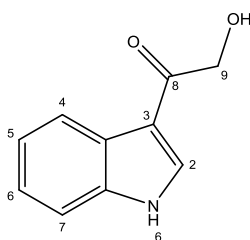
Le gradient consiste en une augmentation de la polarité par l'acétate d'éthyle : 0 à 20 min (100% A), 20-40 min (80% A), 40-50 min (80 % de A, pallier), 50-70 min (60% de A), 70-80 min (60% A, pallier), 80-100 min (40% A), 100-110 min (40% A, pallier), 110-130 min (20% A), 130-140 min (20% A, pallier) et de 140 à 160 min (0% A).

Un dépôt solide de la fraction considérée a été préalablement dissous dans de l'AcOEt et associé à de la silice (SiO<sub>2</sub>). Une fois que l'ensemble [fraction (dans AcOEt) + silice] est évaporé et séché sous azote, le dépôt a été effectué et l'élution a pu commencer. L'éluat a été récolté par fractions de 10 mL.

### 3.4. Descriptif des produits isolés

Les caractéristiques analytiques de l'ensemble des métabolites isolés de MOLA1488 et MOLA1416 sont détaillées ci-dessous.

## 3.4.1. 3-(hydroxyacétyl) indole (D2)



**Sources** : MOLA1488 (*Streptomyces cyaneofuscatus*)

**Aspect** : Pâte jaunâtre

**Isolement** :



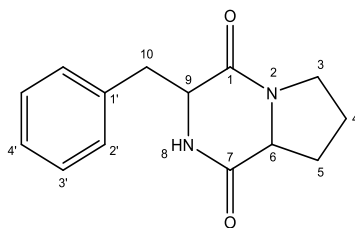
**Formule brute** :  $C_{10}H_9NO_2$  (MM :  $175 \text{ g.mol}^{-1}$ )

**HRESIMS** :  $m/z$   $[M+Na]^+$  198.052558

**RMN** : Déplacements chimiques RMN (ppm) obtenus lors de l'étude ( $CDCl_3$ , 500MHz)

Composé D2 <sup>117</sup>		
Position	$\delta_C$	$\delta_H$ (J en Hz) (allure)
<b>1-NH</b>	-	8.87 (sl)
<b>2-CH</b>	130.58	7.93 (3.00) (d)
<b>3</b>	114.26	-
<b>3a</b>	126.40	-
<b>4-CH</b>	121.94	8.32-8.34 (m)
<b>5-CH</b>	124.11	7.44-7.46 (m)
<b>6-CH</b>	123.12	7.32-7.35 (m)
<b>7-CH</b>	111.65	7.45 (3.0 ; 7.9) (dd)
<b>7a</b>	136.11	-
<b>8</b>	193.19	-
<b>9-CH<sub>2</sub></b>	65.34	4.78 (s)
<b>10-OH</b>	-	3.36

## 3.4.2. Cyclo-(-L-Phe, L-Pro) (D7)



**Sources** : MOLA1488 (*Streptomyces cyaneofuscatus*)

**Aspect** : Pâte jaunâtre

**Isolement** :



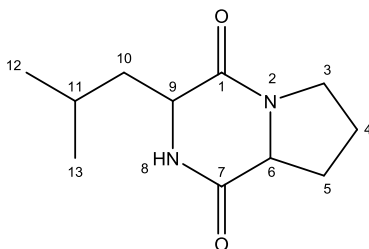
**Formule brute** :  $C_{14}H_{16}N_2O_2$  (MM :  $244 \text{ g.mol}^{-1}$ )

**HRESIMS** :  $m/z$   $[M+Na]^+$  267.110407

**RMN** : Déplacements chimiques RMN (ppm) obtenus lors de l'étude ( $CDCl_3$ , 500 MHz)

Composé D7 <sup>118</sup>		
Position	$\delta_C$	$\delta_H$ (J en Hz) (allure)
1	168.4	-
2	-	-
3-CH <sub>2</sub>	45.45	3.50-3.63 (m)
4-CH <sub>2</sub>	22.55	1.83-1.92 (m)
5-CH <sub>2</sub>	28.34	1.94-2.01 (m)
6-CH	59.12	4.07 (12.8 ; 8.1 ; 6.0) (tt)
7	168.4	-
8-NH	-	5.55 (s)
9-CH	56.14	4.22 (0.9 ; 3.7 ; 10.8) (ddd)
10-CH <sub>2</sub>	36.75	3.48-3.63 (m)
1'	113	-
2'/6'-CH	129.3	7.29-7.32 (m)
3'/5'-CH	129.07	7.23-7.26 (m)
4'-CH	127.58	7.16-7.19 (m)

## 3.4.3. Cyclo-[-L-Leu, L-Pro] (D8)



**Sources** : MOLA1488 (*Streptomyces cyaneofuscatus*) et synthétisé par Dr. Nicolas Gouault

**Aspect** : Pâte jaunâtre

**Isolement** :



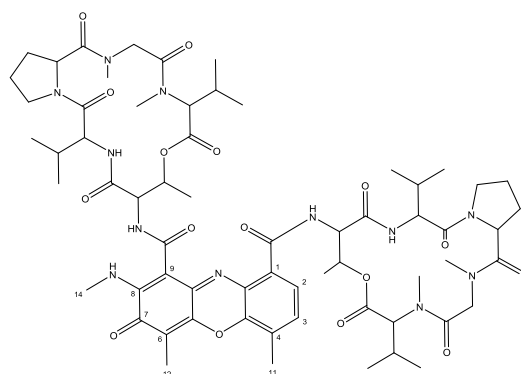
**Formule brute** :  $C_{11}H_{18}N_2O_2$  (MM :  $210 \text{ g.mol}^{-1}$ )

**HRESIMS** :  $m/z$   $[M+Na]^+$  233.126057

**RMN** : Déplacements chimiques RMN (ppm) obtenus lors de l'étude ( $CDCl_3$ , 500 MHz)

Position	Composé D8 <sup>118</sup>	
	$\delta_C$	$\delta_H$ (J en Hz) (allure)
1	166.36	-
2	-	-
3-CH <sub>2</sub>	45.75	3.39-3.60 (m)
4-CH <sub>2</sub>	22.98	1.66-1.71 (m)
5-CH <sub>2</sub>	28.35	2.28-2.32 (m)
6-CH	59.22	4.07 (10-15) (dd)
7	170.32	-
8-NH	-	5.80 (s)
9-CH	53.58	3.97 (10-5) (dd)
10-CH <sub>2</sub>	38.83	1.86-2.06 (m)
11-CH	24.95	1.44-1.52 (m)
12-CH <sub>3</sub>	23.56	0.95 (10) (d)
13-CH <sub>3</sub>	21.38	0.90 (10) (d)

## 3.4.4. N-Méthyl-Dactinomycine (D9)



Sources : MOLA1488 (*Streptomyces cyaneofuscatus*)

Aspect : Pâte jaunâtre

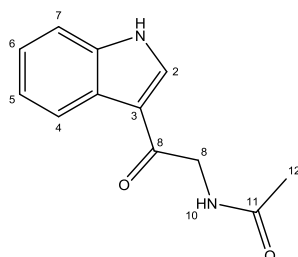
Isolement :



Formule brute :  $C_{64}H_{88}N_{15}O_{16}$  (MM :  $1265 \text{ g.mol}^{-1}$ )

RMN : Déplacements chimiques RMN (ppm) obtenus lors de l'étude ( $CDCl_3$ , 500 MHz)

Classe des carbones	$\delta_C$	$\delta_H$	Attribution	Classe des carbones	$\delta_C$	$\delta_H$	Attribution
Carbonyle	208.92	-	$C_7$ (CO)	Aliphatique	74.75	5.69	Thr CH
	179.14	-	Me-Val CO		74.69	5.69	Thr CH
	174.07	-	Val CO		71.50	5.03	Thr CH
	173.62	-	Val CO		71.34	5.03	Thr CH
	173.17	-	Me-Val CO		59.00	4.23	Me-Val CH
	172.73	-	Thr CO		57.19	4.23	Me-Val CH
	170.05	-	Thr CO		56.33	4.34	Val CH (x2)
	168.92	-			55.01	4.40	Pro CH
	167.54	-	Pro CO (x2)		54.80	4.40	Pro CH
Hétéro-aromatique	166.30	-	Sar CO (x2)		52.88	4.09	Sar $CH_2$
					51.37	4.09	Sar $CH_2$
	147.41	-	$C_8$		47.47	3.51-3.41	Pro $CH_2$ (x2)
	145.87	-	$C_{9a}$		39.45	2.96	Sar-N $CH_3$
	145.05	-	$C_{5a}$		39.28	2.96	Sar-N $CH_3$
	140.52	-	$C_{4a}$		34.91	3.27	Me-Val-N $CH_3$
	132.20	- / 7.12	$C_{1a} / C_3$		34.77	3.27	Me-Val-N $CH_3$
	130.30	7.50	$C_2$		31.94	2.73	Val CH
	129.42	-	$C_1$		31.75	2.73	Val CH
	127.51	-	$C_4$		31.05	2.34-2.09	Pro $CH_2$ (x2)
	113.58	-	$C_6$		29.14	3.06	Me-Val CH
	101.82	-	$C_9$		26.91	3.06	Me-Val CH
	54.80	2.81	NH- $CH_3$		24.74	2.02-1.92	Pro $CH_2$
					22.71	2.02-1.92	Pro $CH_2$
					21.76	1.35	Thr $CH_3$
					21.66	1.35	Thr $CH_3$
					19.29	0.71	Me-Val $CH_3$
					19.13	0.71	Me-Val $CH_3$
					18.96	0.86	Me-Val $CH_3$
					18.87	0.86	Me-Val $CH_3$
					17.79	0.96	Val $CH_3$ (x2)
					17.26	0.96	Val $CH_3$ (x2)
					15.10	2.15	$C_4CH_3$
					7.82	2.34	$C_6CH_3$

3.4.5. *N*-acétyl- $\beta$ -oxotryptamine (D10)

**Sources** : MOLA1488 (*Streptomyces cyaneofuscatus*)

**Aspect** : Pâte jaunâtre

**Isolement** :



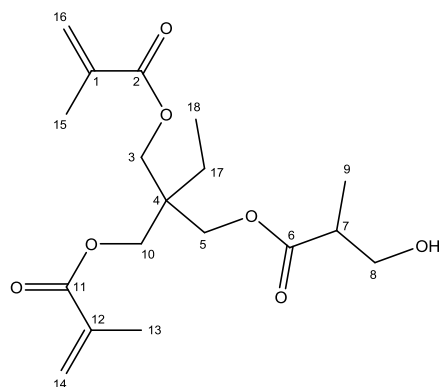
**Formule brute** :  $C_{10}H_9NO_2$  (MM :  $175 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )

**HRESIMS** :  $m/z$   $[M+Na]^+$  198.052558

**RMN** : Déplacements chimiques RMN (ppm) obtenus lors de l'étude ( $CDCl_3$ , 500 MHz)

Composé D10 <sup>120</sup>		
Position	$\delta_C$	$\delta_H$ (J en Hz) (allure)
1-NH	-	8.78 (sl)
2-CH	131.13	7.88 (5) (d)
3	123.17	-
3a	127.67	-
4-CH	122.10	8.26-8.28 (m)
5-CH	129.18	7.31-7.33 (m)
6-CH	127.67	7.28-7.30 (m)
7-CH	129.68	7.40-7.42 (m)
7a	136.19	-
8	199.07	-
9-CH <sub>2</sub>	46.55	4.73 (sl)
10-NH	-	8.83 (s)
11	170.08	-
12-CH <sub>3</sub>	23.20	2.11 (s)

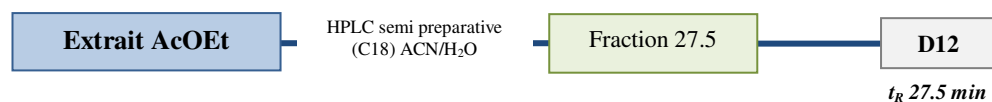
## 3.4.6. Composé D12



**Sources :** MOLA1488 (*Streptomyces cyaneofuscatus*)

**Aspect :** solide légèrement jaunâtre

**Isolement :**



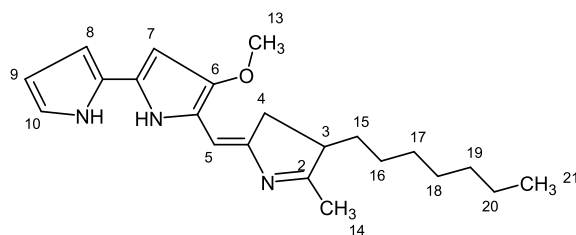
**Formule brute :** C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub> (MM : 175 g.mol<sup>-1</sup>)

**HRESIMS :** *m/z* [M+Na]<sup>+</sup> 198.052558

**RMN :** Déplacements chimiques RMN (ppm) obtenus lors de l'étude (CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 500 MHz)

Composé D12				
Position	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub> (J en Hz)	HMBC	COSY
<b>1-12</b>	135.83	-	-	-
<b>2-11</b>	166.93	-	-	-
<b>3-10</b>	64.48	4.06 (1.3) (m)	C <sub>17</sub> , C <sub>4</sub> , C <sub>5</sub> , C <sub>2-11</sub>	H13-15
<b>4</b>	41.36	-	-	-
<b>5</b>	71.11	3.40 (m)	C <sub>17</sub> , C <sub>4</sub> , C <sub>3-10</sub> , C <sub>5</sub>	-
<b>6</b>	176.10	-	-	-
<b>7</b>	39.41	2.71 (7.0) (q)	C <sub>9</sub> , C <sub>8</sub> , C <sub>6</sub>	H-9, H-8
<b>8</b>	72.98	3.46-3.60) (m)	C <sub>9</sub> , C <sub>7</sub> , C <sub>6</sub>	-
<b>9</b>	13.26	1.13 (7.1) (d)	C <sub>7</sub> , C <sub>8</sub> et C <sub>6</sub>	H-7
<b>13-15</b>	18.02	1.90 (m)	C <sub>1-12</sub> , C <sub>14-16</sub>	H-3-10, H-14-16
<b>14-16</b>	125.10	6.04-5.54 (0.92 ; 1.5) (dd)	C <sub>13-15</sub> , C <sub>1-12</sub> , C <sub>2-11</sub>	H-14-16
<b>17</b>	23.14	1.49 (m)	C <sub>18</sub> , C <sub>4</sub> , C <sub>3</sub> , C <sub>5</sub>	H-18
<b>18</b>	7.26	0.87 (7.6) (t)	C <sub>17</sub> et C <sub>4</sub>	H-17

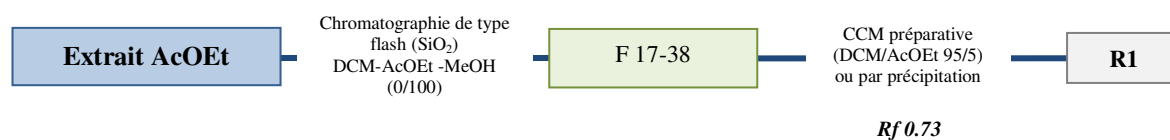
## 3.4.7. 6-méthoxy, 2-méthyl, 3-heptylprodiginine (R1)



**Sources :** MOLA1416 (*Hoeflea phototrophica*)

**Aspect :** poudre rose-violacée

**Isolement :**



**Formule brute :** C<sub>22</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O (MM : 352 g.mol<sup>-1</sup>)

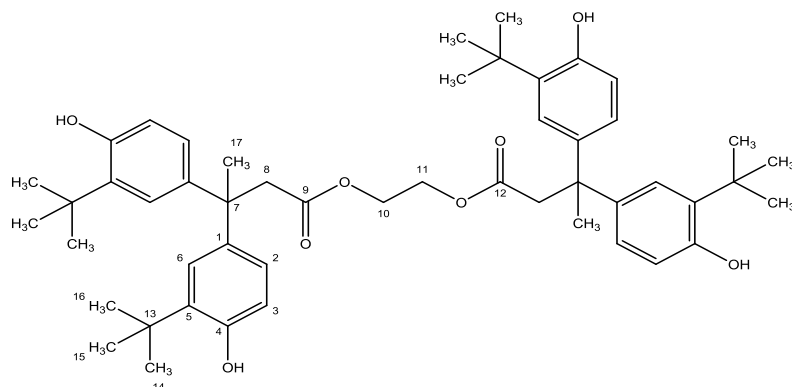
**HRESIMS :** [M+H]<sup>+</sup> m/z 351.23

**RMN :** Déplacements chimiques RMN (ppm) obtenus lors de l'étude (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)

Composé R1		
Position	δ <sub>c</sub>	δ <sub>H</sub> (J en Hz)
2	146.75	-
3	128.23	-
4a	124.86	-
4	128.13	6.63 (2.5) (d)
5a	147.38	-
5	116.00	6.90 (s)
6	165.4	-
7a	120.39	-
7	92.8	6.03 (2.5) (d)
8	116.98	6.86-6.89 (m)
8a	121.98	-
9	111.71	6.29-6.31 (m)
10	126.94	7.23 (1.2 ; 2.5 ; 5.8) (ddd)
13	58.44	3.96 (s)
14	12.20	2.49 (s)
15	30.12	2.34 (7.5) (t)
16-19	25.38-25.45	1.19-1.27 (m)
20	22.65	1.53 (s)



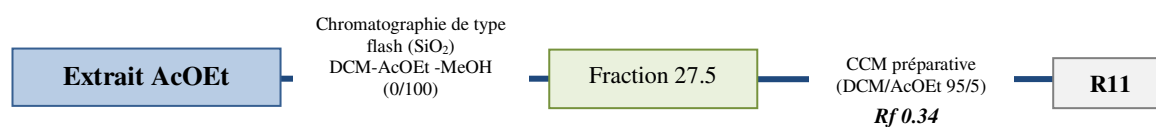
3.4.8. Benzenepropanoate de, 4-(1,1-diméthyléthyl)-β[4-(1,1-diméthyléthyl)-3-(hydroxyphényl)-3-hydroxy-β-méthyl-1,2-éthanediyle



Sources : MOLA1416 (*Hoeflea phototrophica*)

Aspect : solide incolore

Isolement :



Formule brute :  $C_{50}H_{66}O_8$  (MM :  $795 \text{ g.mol}^{-1}$ )

HRESIMS :  $[M-H]^-$   $m/z$  793.4701

RMN : Déplacements chimiques RMN (ppm) obtenus lors de l'étude ( $CD_2Cl_2$ , 500 MHz)

Composé R11			
Position	$\delta_C$	$\delta_H$ (J en Hz)	HMBC
1	140.69	-	-
2	125.38	6.84 (2.4 ; 8.3) (dd)	C <sub>4</sub>
3	115.82	6.51 (8.3) (d)	C <sub>4</sub> , C <sub>5</sub> , C <sub>1</sub> , C <sub>7</sub>
4	152.37	-	-
5	135.17	-	-
6	126.05	7.07 (2.4) (d)	C <sub>4</sub>
7	139.97	-	-
8	46.82	3.03 (s)	C <sub>9</sub> , C <sub>17</sub> , C <sub>7</sub>
9-12	171.22	-	-
10-11	61.39	3.74 (s)	C <sub>9-12</sub>
13	31.81	-	-
14-15-16	29.70	1.31 (s)	C <sub>5</sub> , C <sub>13</sub> , C <sub>14-15-16</sub>
17	28.68	1.79 (s)	C <sub>7</sub>

## 4. Matériels & Méthodes de la Partie 5

### 4.1. Mesure de viabilité de cultures bactériennes par le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tetrazolium (MTT)

La détermination de la viabilité de cultures bactériennes a été réalisée à partir du protocole décrit dans la publication de Wang et *al.*, 2010<sup>135</sup>. Ce dernier a été modifié afin d'être réalisable en microplaques et optimisé sur des bactéries à coloration Gram positive. Par conséquent, 200  $\mu$ L de DMSO, 100  $\mu$ L de culture bactérienne diluée ou non et 10  $\mu$ L de MTT à 5 mg/mL ont été utilisés. Les mesures d'absorbance ont été lues à 620 nm (avant ajout du MTT) et à 540 nm (après reprise par le DMSO). La MRU reflétant la capacité de réduction du MTT par les bactéries a été calculée de la même manière, c'est-à-dire :

$$\text{MRU} = \text{DO}_{540} \times (200 \mu\text{L}/110 \mu\text{L}) \times (1000 \mu\text{L}/100 \mu\text{L}) \times \text{K}/\text{OD}_{620}$$

avec K = facteur de dilution des échantillons permettant d'avoir une DO à 620 nm inférieure ou égale à 0.2 mAu, 200  $\mu$ L correspondant au volume de DMSO, 100  $\mu$ L au volume de la culture bactérienne et 10  $\mu$ L au volume de MTT à 5 mg/mL

### 4.2. Profilages chimiques

#### 4.2.1. Chromatographie liquide couplée à un détecteur à barrette de diode (DAD)

Les profils chimiques par CLHP (type shimadzu ou Dionex) ont été réalisés sur colonne C18 (Waters Spheriborb® ODS2 ou Spheriborb® 5ODS2 NAK J5855 Kontron) à l'aide de gradients binaires : ACN/H<sub>2</sub>O (**Tableaux 46 et 47**) à un débit de 1 mL/min, 20  $\mu$ L injectés à 1 mg/mL.

**Tableau 46** : Gradient d'élution utilisé pour la bioconversion de l'acide lépranique (Autriche)

Tps (min)	0	20	25	26	30
% ACN	10	100	100	10	10
% H <sub>2</sub> O	90	0	0	90	90

**Tableau 47** : Gradient d'élution utilisé pour le profilage chimique en présence de métabolites lichéniques et pour la bioconversion de l'érythrine (Rennes)

Tps (min)	0	20	23	24	30
% ACN	10	100	100	10	10
% H <sub>2</sub> O	90	0	0	90	90

#### 4.2.2. Chromatographie liquide couplée à un détecteur de masse (LC-ESI-MS/MS)

Les analyses LC/MS ont été réalisées dans les mêmes conditions que les extraits de *Roccella fuciformis* et *R. phycopsis* (cf. 2.4.1.2.) en mode négatif.



## *Références Bibliographiques*

---



## Références bibliographiques

---

- (1) Silver, L. L. (2011) Challenges of antibacterial discovery. *Clinical Microbiology Reviews* 24, 71–109.
- (2) Frieden, T. (2013) Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. *Centers for Disease Control and Prevention*, p 114.
- (3) Fukuda, K. (2014) Antimicrobial resistance Global report on surveillance, World Health Organization, Francep 256.
- (4) Bérdy, J. (2005) Bioactive microbial metabolites. *Journal of Antibiotics* 58, 1–26.
- (5) Demain, A L., and Fang, A. (2000) The natural functions of secondary metabolites. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology* 69, 1–39.
- (6) Jose, P. A., Robinson, S., and Jebakumar, D. (2013) Non-streptomycete actinomycetes nourish the current microbial antibiotic drug discovery. *Frontiers in Microbiology* 4, 2008–2010.
- (7) Koehn, F. E., and Carter, G. T. (2005) The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* 4, 206–220.
- (8) Fiedler, H.-P., Bruntner, C., Bull, A. T., Ward, A. C., Goodfellow, M., Potterat, O., Puder, C., and Mihm, G. (2005) Marine actinomycetes as a source of novel secondary metabolites. *Antonie Van Leeuwenhoek* 87, 37–42.
- (9) Bull, A. T., Stach, J. E. M., Ward, A. C., and Goodfellow, M. (2005) Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions. *Antonie Van Leeuwenhoek* 87, 65–79.
- (10) Fu, P., Johnson, M., Chen, H., Posner, B. A, and Macmillan, J. B. (2014) Carpatamides A-C, Cytotoxic Arylamine Derivatives from a Marine-Derived *Streptomyces* sp. *Journal of Natural Products* 77, 1245-1248.
- (11) Goodfellow, M., Stach, J. E. M., Brown, R., Bonda, A. N. V., Jones, A. L., Mexson, J., Fiedler, H.-P., Zucchi, T. D., and Bull, A. T. (2012) *Verrucosipora maris* sp. nov., a novel deep-sea actinomycete isolated from a marine sediment which produces abyssomicins. *Antonie Van Leeuwenhoek* 101, 185–193.
- (12) Oh, D.-C., Williams, P. G., Kauffman, C. a, Jensen, P. R., and Fenical, W. (2006) Cyanosporasides A and B, chloro- and cyano-cyclopenta[a]indene glycosides from the marine actinomycete “*Salinispora pacifica*”. *Organic Letters* 8, 1021–1024.
- (13) Antony-Babu, S., Stach, J. E. M., and Goodfellow, M. (2008) Genetic and phenotypic evidence for *Streptomyces griseus* ecovars isolated from a beach and dune sand system. *Antonie Van Leeuwenhoek* 94, 63–74.
- (14) Watson, E. T., and Williams, S. T. (1974) Studies on the ecology of actinomycetes in soil - VII. Actinomycetes in a coastal sand belt. *Soil biology Biochemistry* 6, 43–52.
- (15) Hong, K., Gao, A.-H., Xie, Q.-Y., Gao, H., Zhuang, L., Lin, H.-P., Yu, H.-P., Li, J., Yao, X.-S., Goodfellow, M., and Ruan, J.-S. (2009) Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China. *Marine Drugs* 7, 24–44.

- (16) Lawrey, J. D., and Diederich, P. (2003) Lichenicolous Fungi: Interactions, Evolution, and Biodiversity. *The Bryologist* 106, 80–120.
- (17) Muggia, L., Gueidan, C., Knudsen, K., Perlmutter, G., and Grube, M. (2013) The lichen connections of black fungi. *Mycopathologia* 175, 523–535.
- (18) Honegger, R. (2012) The Symbiotic Phenotype of Lichen-Forming Ascomycetes and Their Endo- and Epibionts, in *The mycota IX*, pp 287–339.
- (19) Hoffman, M. T., and Arnold, A. E. (2010) Diverse bacteria inhabit living hyphae of phylogenetically diverse fungal endophytes. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 4063–4075.
- (20) Molnár, K., and Farkas, E. (2010) Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review. *Zeitschrift für Naturforschung C* 65, 157–173.
- (21) Ingolfssdottir, K. (2002) Usnic acid. *Phytochemistry* 61, 729–736.
- (22) Lauterwein, M., Oethinger, M., Belsner, K., Peters, T., and Marre, R. (1995) In Vitro Activities of the Lichen Secondary Metabolites Vulpinic Acid , (+)-Usnic Acid , and (-)-Usnic Acid against Aerobic and Anaerobic Microorganisms. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 39, 2541–2543.
- (23) Shukla, V., Joshi, G. P., and Rawat, M. S. M. (2010) Lichens as a potential natural source of bioactive compounds: a review. *Phytochemistry Reviews* 9, 303–314.
- (24) Shrestha, G., and St. Clair, L. L. (2013) Lichens: a promising source of antibiotic and anticancer drugs. *Phytochemistry Reviews* 12, 229–244.
- (25) Bates, S. T., Cropsey, G. W. G., Caporaso, J. G., Knight, R., and Fierer, N. (2011) Bacterial communities associated with the lichen symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 1309–1314.
- (26) Cardinale, M., Berg, G., Grube, M., Vieira de Castro, J., and Müller, H. (2008) In situ analysis of the bacterial community associated with the reindeer lichen *Cladonia arbuscula* reveals predominance of *Alphaproteobacteria*. *FEMS Microbiology Ecology* 66, 63–71.
- (27) González, I., Ayuso-Sacido, A., Anderson, A., and Genilloud, O. (2005) Actinomycetes isolated from lichens: evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. *FEMS Microbiology Ecology* 54, 401–415.
- (28) Cardinale, M., Grube, M., Castro, J. V., Müller, H., and Berg, G. (2012) Bacterial taxa associated with the lung lichen *Lobaria pulmonaria* are differentially shaped by geography and habitat. *FEMS Microbiology Letters* 329, 111–115.
- (29) Cardinale, M., Puglia, A. M., and Grube, M. (2006) Molecular analysis of lichen-associated bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology* 57, 484–495.
- (30) Grube, M., and Berg, G. (2009) Microbial consortia of bacteria and fungi with focus on the lichen symbiosis. *Fungal Biology Reviews* 23, 72–85.
- (31) Grube, M., Cardinale, M., De Castro, J. ., Mu, H., and Berg, G. (2009) Species-specific structural and functional diversity of bacterial communities in lichen symbioses. ISME *International Society. in Microbial Ecology* 3, 1105–1115.

- (32) Hodkinson, B. P., and Lutzoni, F. (2010) A microbiotic survey of lichen-associated bacteria reveals a new lineage from the Rhizobiales. *Symbiosis* 49, 163–180.
- (33) Liba, C. M., Ferrara, F. I. S., Manfio, G. P., Fantinatti-Garboggini, F., Albuquerque, R. C., Pavan, C., Ramos, P. L., Moreira-Filho, C. a, and Barbosa, H. R. (2006) Nitrogen-fixing chemo-organotrophic bacteria isolated from cyanobacteria-deprived lichens and their ability to solubilize phosphate and to release amino acids and phytohormones. *Journal of Applied Microbiology* 101, 1076–1086.
- (34) Muggia, L., Klug, B., Berg, G., and Grube, M. (2013) Localization of bacteria in lichens from Alpine soil crusts by fluorescence in situ hybridization. *Applied Soil and Ecology* 68, 20–25.
- (35) An, S., Xiao, T., and Yokota, A. (2008) *Schumannella luteola* gen . nov ., sp . nov ., a novel genus of the family Microbacteriaceae. *Journal of General and Applied Microbiology* 54, 253–258.
- (36) An, S., Xiao, T., and Yokota, A. (2009) *Leifsonia lichenia* sp . nov ., isolated from lichen in Japan. *Journal of General and Applied Microbiology* 55, 339–343.
- (37) Davies, J., Wang, H., Taylor, T., Warabi, K., Huang, X.-H., and Andersen, R. J. (2005) Uncialamycin, A New Eneidine Antibiotic. *Organic Letters* 7, 5233–5236.
- (38) Li, B., Xie, C., and Yokota, A. (2007) *Nocardioides exalbidus* sp . nov ., a novel actinomycete isolated from lichen in Izu-Oshima Island , Japan. *Actinomycetologica* 21, 22–26.
- (39) Bjelland, T., Grube, M., Hoem, S., Jorgensen, S. L., Daae, F. L., Thorseth, I. H., and Øvreås, L. (2011) Microbial metacommunities in the lichen-rock habitat. *Environmental Microbiology Reports* 3, 434–442.
- (40) Boustie, J., and Grube, M. (2005) Lichens-a promising source of bioactive secondary metabolites. *Plant Genetetic Resources* 3, 273–28.
- (41) Dobson, F. (2005) Lichens : An illustrated guide to the British and Irish species Shoulg, Royaume-Uni, pp 1–480.
- (42) Nash, T. H. (2008) Lichen Biology, Cambridge, Royaume-Uni, p 498.
- (43) Ozenda, P., and Clauzade, G. (1970) Les lichens : étude biologique et flore illustrée Masson, Paris, p 801.
- (44) Raven, P. H., Evert, R. F., and Eichhorn, E. (2000) Biologie végétale De Boeck, Royaume-Uni, p 733.
- (45) Purvis, W. (2000) Lichens, London, p 112.
- (46) Stocker-Wörgötter, E. (2008) Metabolic diversity of lichen-forming ascomycetous fungi: culturing, polyketide and shikimate metabolite production, and PKS genes. *Natural Products Reports* 25, 188–200.
- (47) De Castro, J. . J. V., Mu, H., Berg, G., Grube, M., Cardinale, M., and Müller, H. (2009) Species-specific structural and functional diversity of bacterial communities in lichen symbioses. *ISME Journal of systematics and Microbiology Ecology* 3, 1105–15.



- (48) Coxson, D. S., and Nadkarni, N. M. (1995) Ecological roles of epiphytes Forest, in *Ecological Roles of Epiphytes in Nutrient Cycles*, pp 495–543.
- (49) Barger, N. N., Herrick, J. E., Zee, J., and Belnap, J. (2006) Impacts of Biological Soil Crust Disturbance and Composition on C and N Loss from Water Erosion. *Biogeochemistry* 77, 247–263.
- (50) Lalley, J. S., and Viles, H. A. (2007) Recovery of lichen-dominated soil crusts in a hyper-arid desert. *Biodiversity & Conservation* 17, 1–20.
- (51) Evans, R. D., and Lange, O. L. (2003) Biological Soil Crusts and Ecosystem Nitrogen and Carbon Dynamics, in *Biological Soil Crusts: Structure, Function, and Management*, pp 263–279.
- (52) Evans, R. D., and Johansen, J. R. (1999) Microbiotic Crusts and Ecosystem Processes. *Plant Sciences* 18, 183–225.
- (53) Longton, R. E. (1988) The biology of polar bryophytes and lichens Cambridge, Royaume-Uni, p 391.
- (54) Delmail, D., Grube, M., Parrot, D., Cook-moreau, J., Boustie, J., Labrousse, P., and Tomasi, S. (2013) Ecophysiology and Responses of Plants under Salt Stress, Springer, New York, pp 115–148.
- (55) Van Haluwyn, C., and Asta, J. (2009) Guide des lichens de France : Lichens des arbres, Belin, Paris, p 231.
- (56) Biéro, T., Laroubine, C., Lottin, N., and Vaudoré, D. (2008) Les lichens de Normandie (Actes du Colloque). *Val d'Orne Environ. Société Linnéenne Normandie Parc Nat. régional Normandie Maine*, p 94.
- (57) Sérusiaux, E., Diederich, P., and Lambinon, J. (2004) Les macrolichens de Belgique, du Luxembourg et du nord de la France - Clés de détermination, Luxembourg, p 192..
- (58) Zopf, W. F. (1907) Die Flechtenstoffe: In Chemischer, Botanischer, Pharmakologischer Und Technischer Beziehung, Germany, p 468.
- (59) Elix, J. A., and Stocker-Wörgötter, E. (2008) Chapitre 7. Biochemistry and secondary metabolites, in *Lichen Biology*, Cambridge, Royaume-Uni, pp 1116–145.
- (60) Bandaranayake, W. M. (1997) Mycosporines : are they nature's sunscreens ? *Natural Products Reports* 159–172.
- (61) Bačkorová, M., Jendželovský, R., Kello, M., Bačkor, M., Mikeš, J., and Fedoročko, P. (2012) Lichen secondary metabolites are responsible for induction of apoptosis in HT-29 and A2780 human cancer cell lines. *Toxicology In Vitro* 26, 462–8.
- (62) Oetl, S. K., Gerstmeier, J., Khan, S. Y., Wiechmann, K., Bauer, J., Atanasov, A. G., Malainer, C., Awad, E. M., Uhrin, P., Heiss, E. H., Waltenberger, B., Remias, D., Breuss, J. M., Boustie, J., Dirsch, V. M., Stuppner, H., Werz, O., and Rollinger, J. M. (2013) Imbricarinic acid and perlatolic acid: multi-targeting anti-inflammatory depsides from *Cetrelia monachorum*. *PLoS One* 8, 1–10.
- (63) Nguyen, K.-H., Chollet-Krugler, M., Gouault, N., and Tomasi, S. (2013) UV-protectant metabolites from lichens and their symbiotic partners. *Natural Products Reports* 30, 1490–508.

- (64) Nardelli, A., Giménez-Arnau, E., Bernard, G., Lepoittevin, J.-P., and Goossens, A. (2009) Is a low content in atranol/chloroatranol safe in oak moss-sensitized individuals? *Contact Dermatitis* 60, 91–5.
- (65) Placzek, M., Frömel, W., Eberlein, B., Gilbertz, K.-P., and Przybilla, B. (2007) Evaluation of phototoxic properties of fragrances. *Acta Dermato-Venereologica* 87, 312–6.
- (66) Aptroot, A., and Schumm, F. (2011) *Fruticose Roccellaceae - An anatomical-microscopical Atlas and Guide with a worldwide Key and further Notes on some crustose Roccellaceae or similar Lichens* Booksellers, Germany, p 375.
- (67) Ahti, T., Jorgensen, P. M., Kristinsson, H., Moberg, R., Sochting, U., and Thor, G. (2007) *Nordic Lichen Flora, Vol.3 The Nordic.*, p 219.
- (68) Tiévant, P. (2001) *Guide des Lichens* Delachaux, Paris, p 304.
- (69) Bohmana-Lindgren, G. (1972) Chemical studies on Lichens - XXXIII Roccanin, a new cyclic tetrapeptide from *Roccella canariensis*. *Tetrahedron* 28, 4625–4630.
- (70) Strack, D., Feige, G. B., and Kroll, R. (1979) Screening of aromatic secondary lichen substances by high performance liquid chromatography. *Zeitschrift für Naturforschung* 34c, 695–698.
- (71) Aberhart, D. J., Overton, K. H., and Hunck, S. (1969) Studies on Lichens Substances. Pat LXII. Aromatic Constituents of the Lichen *Roccella fuciformis* DC. A revised Structure for Lepranic Acid. *Journal of Chemical Society* 8, 704–707.
- (72) Huneck, S., and Yoshimura, I. (1996) *Identification of lichen substances*, Springer, Berlin, p 493.
- (73) Huneck, S. (1972) 6-Hydroxymethyleugenitin, ein neues chromon aus *Roccella fuciformis*. *Phytochemistry* 11, 1489–1490.
- (74) Culberson, C. F. (1970) Supplement to “Chemical and botanical guide to lichen Products”. *Bryologist* 73, 177–377.
- (75) Culberson, C. F. (1969) *Chemical and botanical guide to lichens products* (Reprint, Ed.) Lubrecht & Cramer LTD, p 506.
- (76) Bogo, D., de Matos, M. F. C., Honda, N. K., Pontes, E. C., Oguma, P. M., da Santos, E. C. S., de Carvalho, J. E., and Nomizo, A. (2010) In vitro antitumour activity of orsellinates. *Zeitschrift für Naturforschung C* 65, 43–8.
- (77) Roullier, C., Chollet-Krugler, M., Bernard, A., and Boustie, J. (2009) Multiple dual-mode centrifugal partition chromatography as an efficient method for the purification of a mycosporine from a crude methanolic extract of *Lichina pygmaea*. *Journal of Chromatography B* 877, 2067–73.
- (78) Roullier, C., Chollet-Krugler, M., Pferschy-Wenzig, E.-M., Maillard, A., Rechberger, G. N., Legouin-Gargadennec, B., Bauer, R., and Boustie, J. (2011) Characterization and identification of mycosporines-like compounds in cyanolichens. Isolation of mycosporine hydroxyglutamicol from *Nephroma laevigatum* Ach. *Phytochemistry* 72, 1348–57.
- (79) Roullier, C. (2010) Recherche de mycosporines et de dérivés aminés lichéniques d'intérêt pour les cancers photoinduits . Etude phytochimique d'un lichen marin : *Lichina pygmaea* ( Lightf.) C, Université de Rennes 1, p 258.

- (80) Sinha, R. P., Singh, S. P., and Häder, D.-P. (2007) Database on mycosporines and mycosporine-like amino acids (MAAs) in fungi, cyanobacteria, macroalgae, phytoplankton and animals. *J. Photochemistry Photobiology B* 89, 29–35.
- (81) Carreto, J. I., Carignan, M. O., and Montoya, N. G. (2004) A high-resolution reverse-phase liquid chromatography method for the analysis of mycosporine-like amino acids (MAAs) in marine organisms. *Marine Biology* 146, 237–252.
- (82) Roullier, C., Chollet-Krugler, M., Weghe, P. Van De, Devehat, F. L.-L., and Boustie, J. (2010) A novel aryl-hydrazide from the marine lichen *Lichina pygmaea*: isolation, synthesis of derivatives, and cytotoxicity assays. *Bioorganics Medicinal Chemistry Letters* 20, 4582–6.
- (83) Torres, A., Hochberg, M., Pergament, I., Smoum, R., Niddam, V., Dembitsky, V. M., Temina, M., Dor, I., Lev, O., Srebnik, M., and Enk, C. D. (2004) A new UV-B absorbing mycosporine with photo protective activity from the lichenized ascomycete *Collema cristatum*. *European Journal of Biochemistry* 271, 780–784.
- (84) Büdel, B., Karsten, U., and Garcia-Pichel, F. (1997) Ultraviolet-absorbing scytonemin and mycosporine-like amino acid derivatives in exposed, rock-inhabiting cyanobacterial lichens. *Oecologia* 112, 165–172.
- (85) Temina, M., Levitsky, D. O., and Dembitsky, V. M. (2010) Chemical Constituents of the Epiphytic and Lithophilic Lichens of the Genus *Collema*. *Recent Natural Products* 4, 79–86.
- (86) Honegger, R., Axe, L., and Edwards, D. (2013) Bacterial epibionts and endolichenic actinobacteria and fungi in the Lower Devonian lichen *Chlorolichenomycites salopensis*. *Fungal Biology* 117, 512–8.
- (87) Parrot, D., Peresse, T., Hitti, E., Carrié, D., Grube, M., and Tomasi, S. (2014) Qualitative and spatial metabolite profiling of lichens by LC-MS approach combined with optimization extraction. *Phytochemical Analysis (sous presse)*.
- (88) Mandal, V., Mohan, Y., and Hemalatha, S. (2008) Microwave assisted extraction of curcumin by sample–solvent dual heating mechanism using Taguchi L9 orthogonal design. *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis* 46, 322–327.
- (89) Amarouche, S. (2013) Caractérisation d’une méthode de mesure : étape clé dans le processus de validation. *Technique de l’ingénieur, ressources documentaires* 1–18.
- (90) Laessøe, T., Srikikulchai, P., Fournier, J., Köpcke, B., and Stadler, M. (2010) Leprarie acid derivatives as chemotaxonomic markers in *Hypoxylon aeruginosum*, *Chlorostroma subcubisporum* and *C. cyaninum*, sp. nov. *Fungal Biology* 114, 481–9.
- (91) Huneck, S. (1968) Flechteninhaltsstoffe - XXXI Massenspektrometrie und ihre anwendung auf strukturelle und stereochemische probleme - CXXIII Massenspektrometrie von depsiden, depsidonen, depsonen, dibenzofuranen und diphenylbutadienen mit positiven und negativen ionen. *Tetrahedron* 24, 2707–2755.
- (92) Whitehead, K., and Hedges, J. I. (2002) Analysis of mycosporine-like amino acids in plankton by liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. *Marine Chemistry* 80, 27–39.
- (93) Carreto, J. I., and Carignan, M. O. (2011) Mycosporine-like amino acids: relevant secondary metabolites. Chemical and ecological aspects. *Marine Drugs* 9, 387–446.

- (94) Pettit, G. R., Zhang, Q., Pinilla, V., Herald, D. L., Doubek, D. L., and Duke, J. A. (2004) Isolation and structure of gustastatin from the Brazilian nut tree *Gustavia hexapetala*. *Journal of Natural Products* 67, 983–5.
- (95) Geiger, M. (2009) Mise au point d'une démarche de profilage des métabolites primaires et secondaires du lichen *Roccella fuciformis*. Application à l'étude du métabolisme en réponse à différentes conditions environnementales, Rennes, p 19.
- (96) Huneck, S., Schmidt, J., and Tabacchi, R. (1989) Thermal decomposition of lichen depsides. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 44, 1283–1289.
- (97) Courvalin, P., Dubreuil, L., Jarlier, V., Jehl, F., Lambert, T., Leclercq, R., Lina, G., Merens, A., Plesiat, P., Ploy, M. C., Quentin, C., Soussy, C. J., Varon, E., and Weber, P. (2013) Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie, p 60.
- (98) Bertrand, J.-C., Caumette, P., Lebaron, P., Matheron, R., and Normand, P. (2011) Ecologie microbienne Microbiologie des milieux naturels et anthropisés Presses universitaires des Pays de l'Adour, p 1002.
- (99) Ismed, F. (2012) Phytochimie de lichens du genre *Stereocaulon* : étude particulière de *S. halei* Lamb et *S. montagneanum* Lamb , deux lichens recoltés en Indonésie. Université de Rennes 1, p 284.
- (100) Grube, M., Berg, G., Andrésson, Ó. S., Vilhelmsson, O., Dyer, P. S., and Miao, V. P. W. (2014) Lichen Genomics : Prospects and Progress, in *The Ecological Genomics of Fungi*, pp 191–212.
- (101) Schneider, T., Schmid, E., de Castro, J. V., Cardinale, M., Eberl, L., Grube, M., Berg, G., and Riedel, K. (2011) Structure and function of the symbiosis partners of the lung lichen (*Lobaria pulmonaria* L. Hoffm.) analyzed by metaproteomics. *Proteomics* 11, 2752–6.
- (102) Cardinale, M., Steinová, J., Rabensteiner, J., Berg, G., and Grube, M. (2012) Age, sun and substrate: triggers of bacterial communities in lichens. *Environmental Microbiology Reports* 4, 23–28.
- (103) Cardinale, M., Grube, M., and Berg, G. (2011) *Frondehabitans cladoniophilus* sp. nov., an actinobacterium of the family *Microbacteriaceae* isolated from lichen, and emended description of the genus *Frondehabitans*. *International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology* 61, 3033–8.
- (104) Motohashi, K., Takagi, M., Yamamura, H., Hayakawa, M., and Shin-ya, K. (2010) A new angucycline and a new butenolide isolated from lichen-derived *Streptomyces* spp. *Journal of Antibiotics* 63, 545–548.
- (105) Cheenpracha, S., Vidor, N. B., Yoshida, W. Y., Davies, J., and Chang, L. C. (2010) Coumabiotics A-F , Aminocoumarins from an Organic Extract of *Streptomyces* sp . L-4-4. *Journal of Natural Products* 73, 880–884.
- (106) Williams, D. E., Davies, J., Patrick, B. O., Bottiell, H., Tarling, T., Roberge, M., and Andersen, R. J. (2008) Cladonioides A-G Tryptophan-Derived Alkaloids Produced in Culture by *Streptomyces uncialis*. *Organic Letters* 10, 3501–3504.
- (107) Selbmann, L., Zucconi, L., Ruisi, S., Grube, M., Cardinale, M., and Onofri, S. (2009) Culturable bacteria associated with Antarctic lichens: affiliation and psychrotolerance. *Polar Biology* 33, 71–83.

- (108) Printzen, C., Fernández-Mendoza, F., Muggia, L., Berg, G., and Grube, M. (2012) Alphaproteobacterial communities in geographically distant populations of the lichen *Cetraria aculeata*. *FEMS Microbiology Ecology* 82, 316–25.
- (109) Ellis, C. J., Crittenden, P. D., Scrimgeour, C. M., and Ashcroft, C. J. (2005) Translocation of <sup>15</sup>N indicates nitrogen recycling in the mat-forming lichen *Cladonia portentosa*. *New Phytology* 168, 423–34.
- (110) Gtari, M., Ghodhbane-Gtari, F., Nouioui, I., Beauchemin, N., and Tisa, L. S. (2012) Phylogenetic perspectives of nitrogen-fixing *actinobacteria*. *Archives in Microbiology* 194, 3–11.
- (111) Jean, M., Tomasi, S., and van de Weghe, P. (2012) When the nine-membered enediynes play hide and seek. *Organics Biomolecular Chemistry* 10, 7453–6.
- (112) Kim, O.-S., Cho, Y.-J., Lee, K., Yoon, S.-H., Kim, M., Na, H., Park, S.-C., Jeon, Y. S., Lee, J.-H., Yi, H., Won, S., and Chun, J. (2012) Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology* 65, 716–721.
- (113) Lozupone, C., and Knight, R. (2005) UniFrac : a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 8228–8235.
- (114) Hertweck, C. (2009) The biosynthetic logic of polyketide diversity. *Angewandte Chemie International Edition* 48, 4688–716.
- (115) Schrempf, H. (2006) The Family *Streptomycetaceae*, Part II : Molecular Biology. *Prokaryotes* 3, 605–622.
- (116) Kämpfer, P. (2006) The Family *Streptomycetaceae* , Part I: Taxonomy. *Prokaryotes* 3, 538–604.
- (117) Olano, C., Méndez, C., and Salas, J. A. (2009) Antitumor compounds from marine *actinomycetes*. *Marine Drugs* 7, 210–48.
- (118) Martínez-Luis, S., Gómez, J. F., Spadafora, C., Guzmán, H. M., and Gutiérrez, M. (2012) Antitrypanosomal alkaloids from the marine bacterium *Bacillus pumilus*. *Molecules* 17, 11146–55.
- (119) Rui, H., Bochu, W., Wakimoto, T., Manyuan, W., Liancai, Z., and Ikuro, A. (2013) Cyclopeptides from metagenomic library of a japanese marine sponge. *Journal of Brazilian Chemical Society* 24, 1926–1932.
- (120) Begum, A. S., Basha, S. A., Raghavendra, G., Venkata, M., Kumar, N., Singh, Y., Patil, J. V, Tanemura, Y., and Fujimoto, Y. (2014) Isolation and Characterization of Antimicrobial Cyclic Dipeptides from *Pseudomonas fluorescens* and Their Efficacy on Sorghum Grain Mold Fungi. *Chemical Biodiversity* 11, 92–100.
- (121) Bernart, M., and Gerwick, W. H. (1990) 3-(Hydroxyacetyl)indole, a plant growth regulator from the oregon red alga *Prionitis lanceolata*. *Phytochemical Analysis* 29, 3697–3698.
- (122) Yang, S.-W., and Cordell, G. A. (1997) Metabolism studies of indole derivatives using a staurosporine producer, *Streptomyces staurosporeus*. *Journal of Natural Products* 60, 44–48.

- (123) Borthwick, A. D. (2012) 2,5-Diketopiperazines: synthesis, reactions, medicinal chemistry, and bioactive natural products. *Chemical Reviews* 112, 3641–3716.
- (124) Zhou, X., Xu, T., Yang, X., Liu, Y., and Utilization, S. (2010) Diketopiperazines from Marine Organisms. *Chemical Biodiversity* 7, 2809–2829.
- (125) Carvalho, M. P., and Abraham, W. R. (2012) Antimicrobial and biofilm inhibiting diketopiperazines. *Current Medicinal Chemistry* 19, 3564–3577.
- (126) Jihong, J., Bo, Y., Yongqiang, C., Youjian, F., Fengmei, C., Xiuyun, J., Li, W., Xiaoying, C., Sheng, Q., Jinjuan, L., and Guangkai, B. Fermentative production of 2-methyl-actinomycin D by *Streptomyces recifensis* (2012) Brevet CN102617707A, p 14.
- (127) Praveen, V., and Tripathi, C. K. M. (2009) Studies on the production of actinomycin-D by *Streptomyces griseoruber* - a novel source. *Letters and Applied Microbiology* 49, 450–5.
- (128) Hollstein, U. (1973) Actinomycin. Chemistry and Mechanism of Action. *Chemical Reviews* 74, 625–652.
- (129) Yan, P., Song, Y., Sakuno, E., Nakajima, H., Nakagawa, H., and Yabe, K. (2004) Cyclo ( L - Leucyl- L -Prolyl ) Produced by *Achromobacter xylosoxidans* Inhibits Aflatoxin Production by *Aspergillus parasiticus*. *Applied Environmental Microbiology* 70, 7466–7473.
- (130) Biebl, H., Tindall, B. J., Lu, H., Allgaier, M., and Wagner-do, I. (2006) *Hoeflea phototrophica* sp . nov ., a novel marine aerobic alphaproteobacterium that forms bacteriochlorophyll a. *International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology* 56, 821–826.
- (131) Fiebig, A., Pradella, S., Petersen, J., Michael, V., Päufer, O., Rohde, M., Göker, M., Klenk, H.-P., and Wagner-Döbler, I. (2013) Genome of the marine alphaproteobacterium *Hoeflea phototrophica* type strain (DFL-43(T)). *Standards Genomic Sciences* 7, 440–8.
- (132) Soliev, A. B. (2012) Pigmented bioactive compounds from marine bacteria and their mechanisms of action involved in cytotoxicity. Université de Kochi, Japon, p 120.
- (133) Bruns, N., Glukhov, E., Wodtke, A., and Felicio, R. De. (2014) Molecular Networking as a Dereplication Strategy. *NIH Journal of Natural Products* 76, 1686–1699.
- (134) Garg, N., Kapon, C., Lim, Y. W., Koyama, N., Vermeij, M. J. a., Conrad, D., Rohwer, F., and Dorrestein, P. C. (2014) Mass spectral similarity for untargeted metabolomics data analysis of complex mixtures. *International Journal of Mass Spectrometry* (sous presse)
- (135) Wang, H., Cheng, H., Wang, F., Wei, D., and Wang, X. (2010) An improved 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) reduction assay for evaluating the viability of *Escherichia coli* cells. *Journal of Microbiology Methods* 82, 330–3.
- (136) Mosbach, K., and Ehrensverd, U. (1966) Studies on lichen enzymes Part1. Preparation and properties of a depside hydrolysing esterase and of orsellinic acid decarboxylase. *Biochemical Biophysical Research Communication* 22, 145–150.
- (137) Parrot, D., Jan, S., Baert, N., Guyot, S., and Tomasi, S. (2013) Comparative metabolite profiling and chemical study of *Ramalina siliquosa* complex using LC-ESI-MS/MS approach. *Phytochemistry* 89, 114–124.

- (138) Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. a, Berg-Lyons, D., Lozupone, C. a, Turnbaugh, P. J., Fierer, N., and Knight, R. **(2011)** Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108 Suppl 1*, 4516–22.

## *Annexes*

---



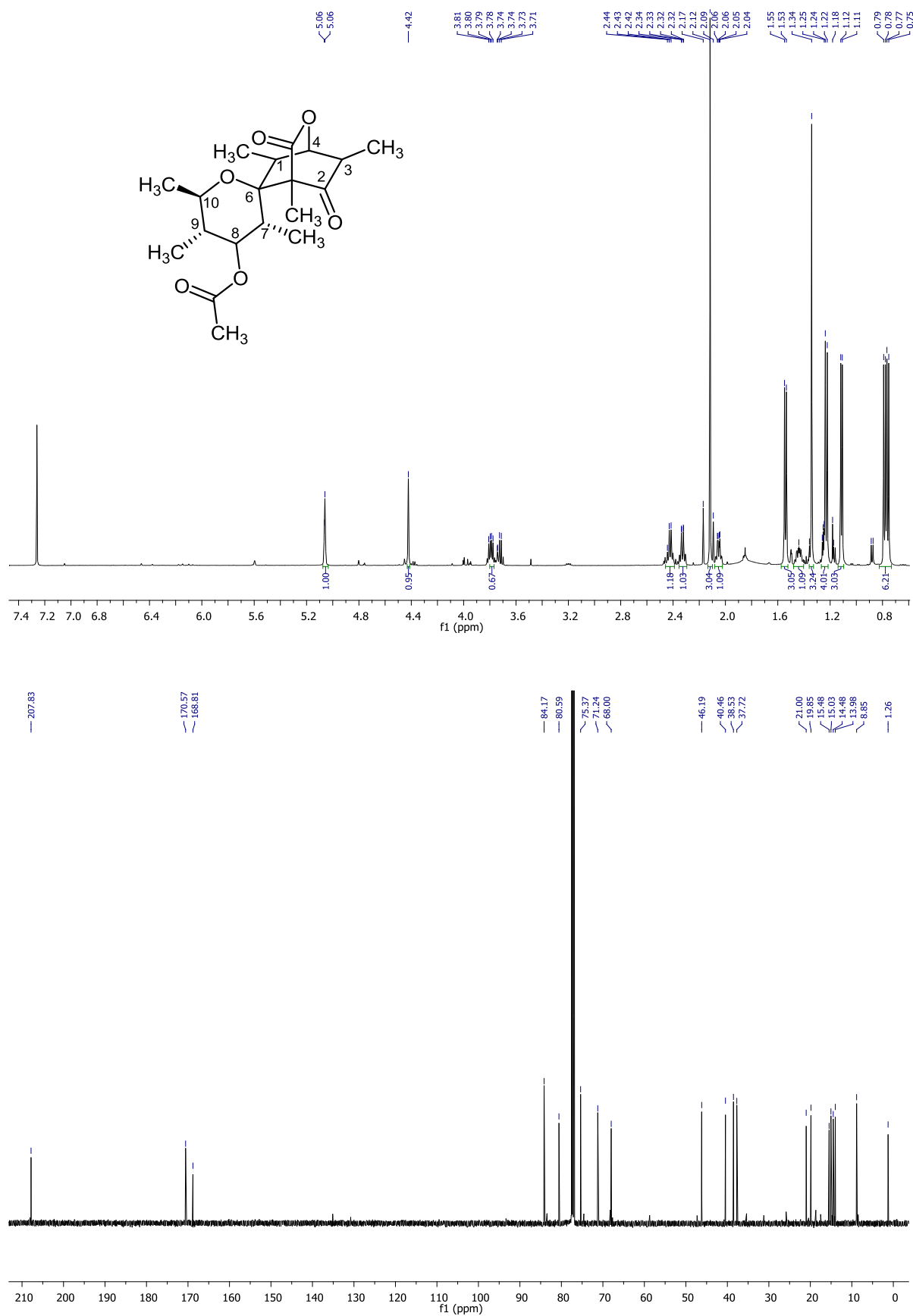


## Annexes

### **Annexe 1 : Résultats des tests statistiques (ANOVA) de l'optimisation des conditions d'extraction des lichens**

<b>Rendement d'extraction total</b>				
Source	Somme des écarts	Moyenne des écarts	F-ratio	p-Value
Système de broyage	47.34	47.34	25.74	0
Nombre de solvant	205.64	205.64	111.80	0
Volume	58.99	58.99	32.07	0
Agitation	7.26	7.26	3.95	0.0379
Erreur	16.55	16.55		
Total	335.79			
<b>Rendement en érythrine</b>				
Source	Somme des écarts	Moyenne des écarts	F-ratio	p-Value
Système de broyage	184.49	184.49	208.39	0
Nombre de solvant	10.49	10.49	11.84	0
Volume	6.13	6.13	6.92	0.0059
Agitation	16.78	16.78	18.96	0
Erreur	7.97	7.97		
Total	225.85			
<b>Rendement en acide lépranique</b>				
Source	Somme des écarts	Moyenne des écarts	F-ratio	p-Value
Système de broyage	0.21	0.21	0.80	0.466
Nombre de solvant	0.89	0.89	3.40	0.056
Volume	0.50	0.50	1.94	0.173
Agitation	1.86	1.86	7.13	0.005
Erreur	2.34	2.34		
Total	5.80			

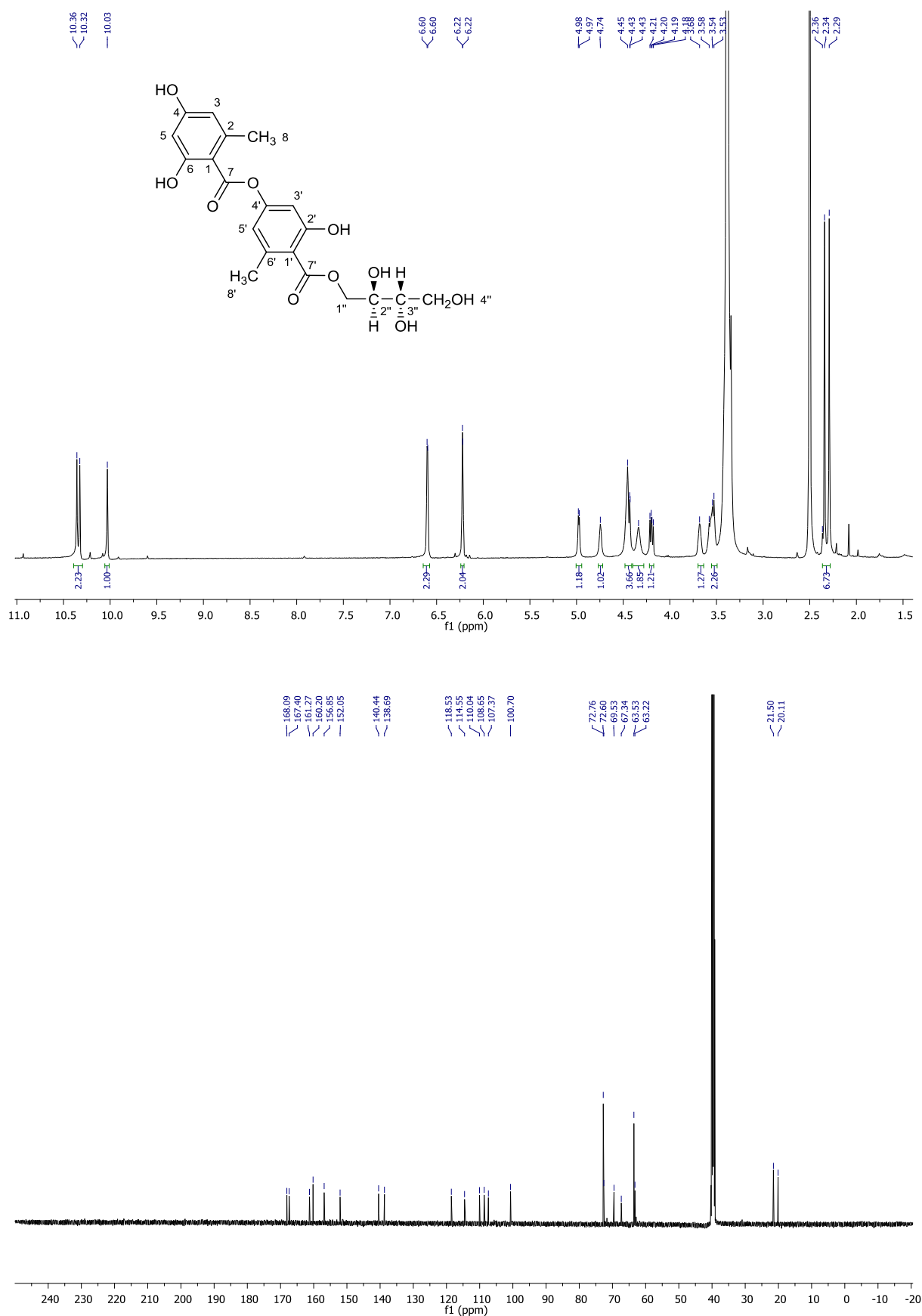
**Annexe 2 : Spectres RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) de l'acétylportentol dans le  $\text{CDCl}_3$**



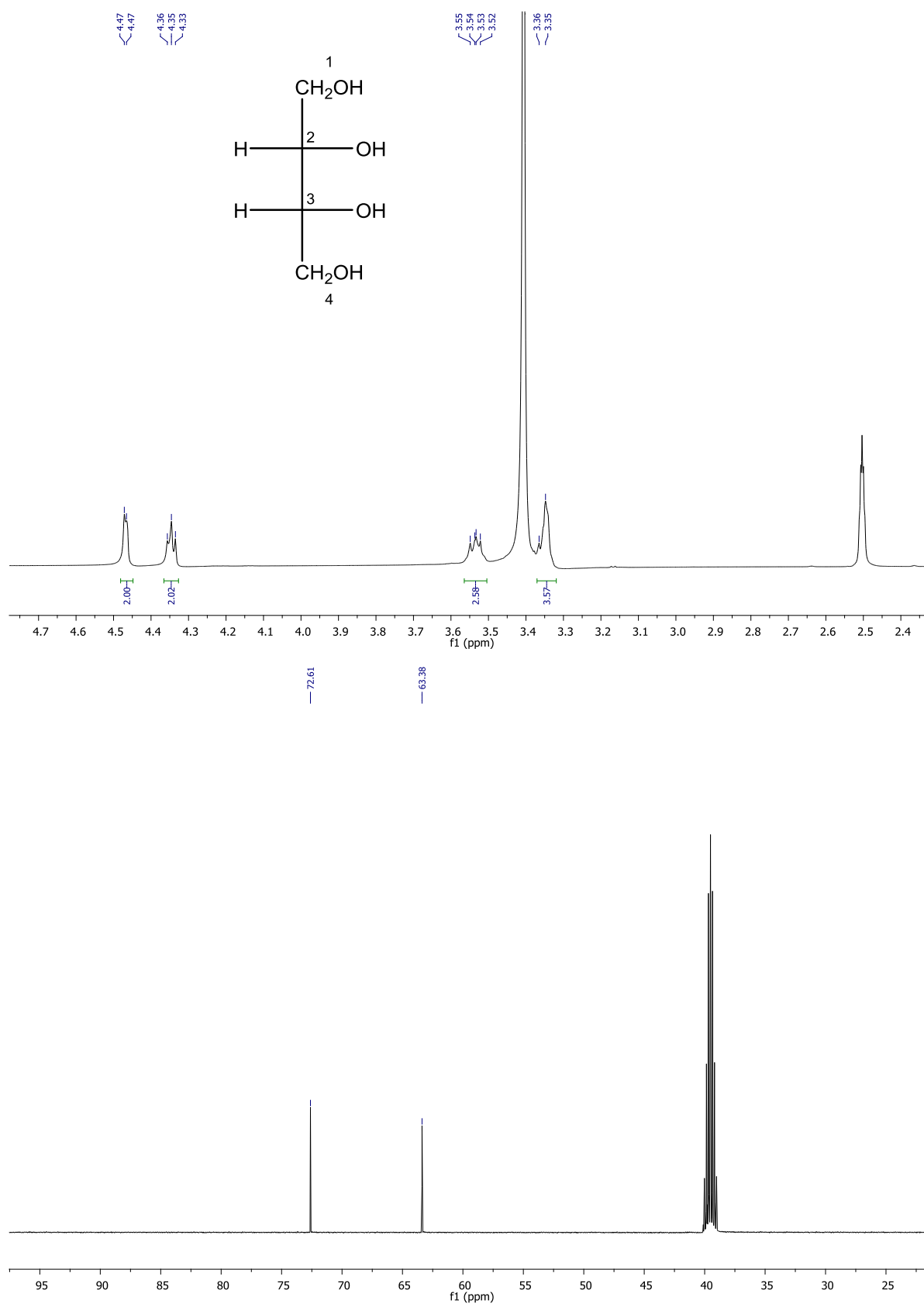
**Annexe 3 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz) de l'acide léprarique dans le  $\text{CDCl}_3$**



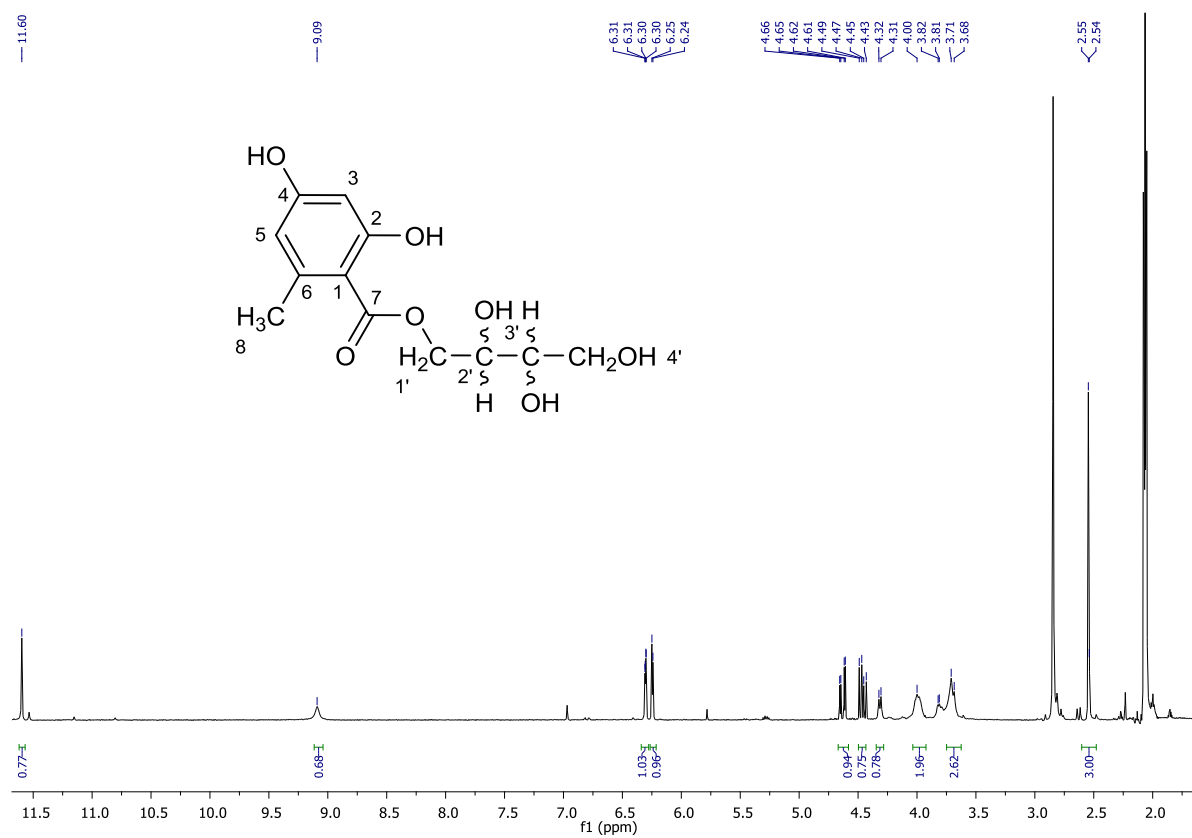
**Annexe 4 : Spectres RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) de l'érythrine dans le DMSO- $d_6$**

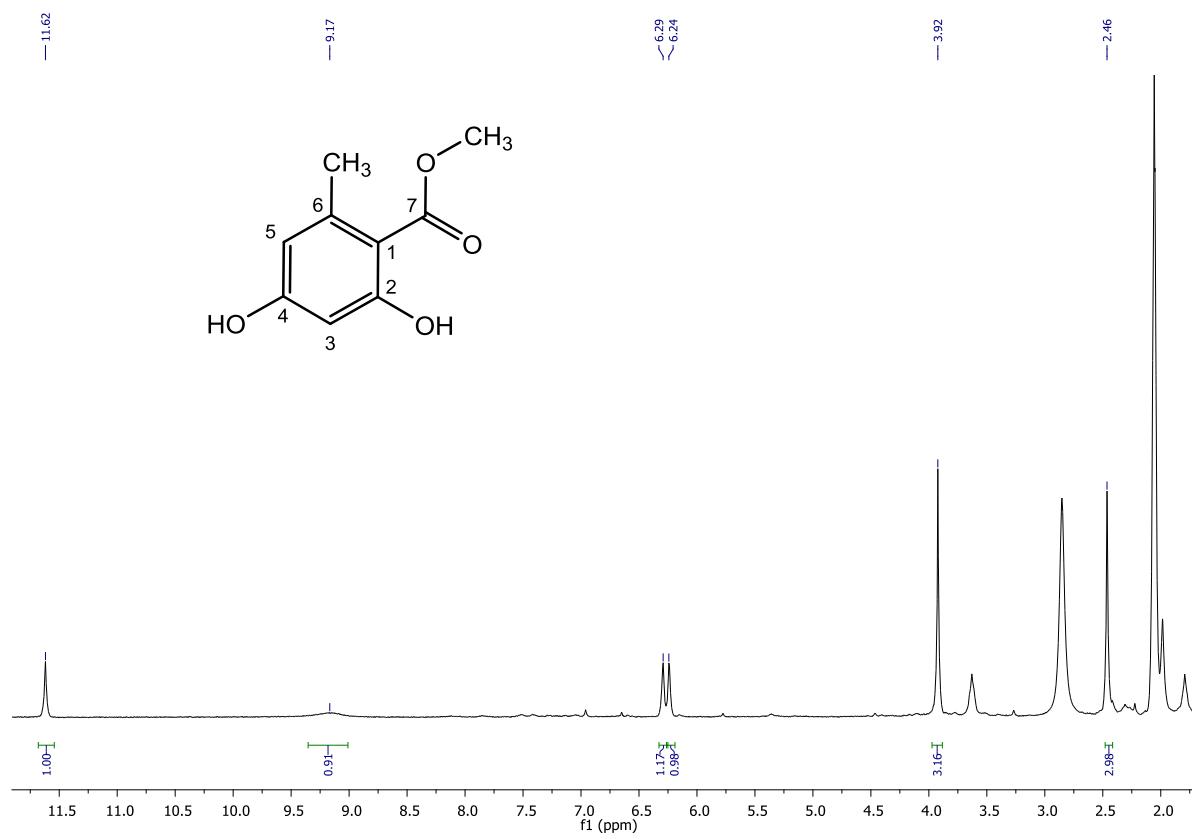


**Annexe 5 : Spectres RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et  $^{13}\text{C}$  du méso-érythritol dans le DMSO- $d_6$**



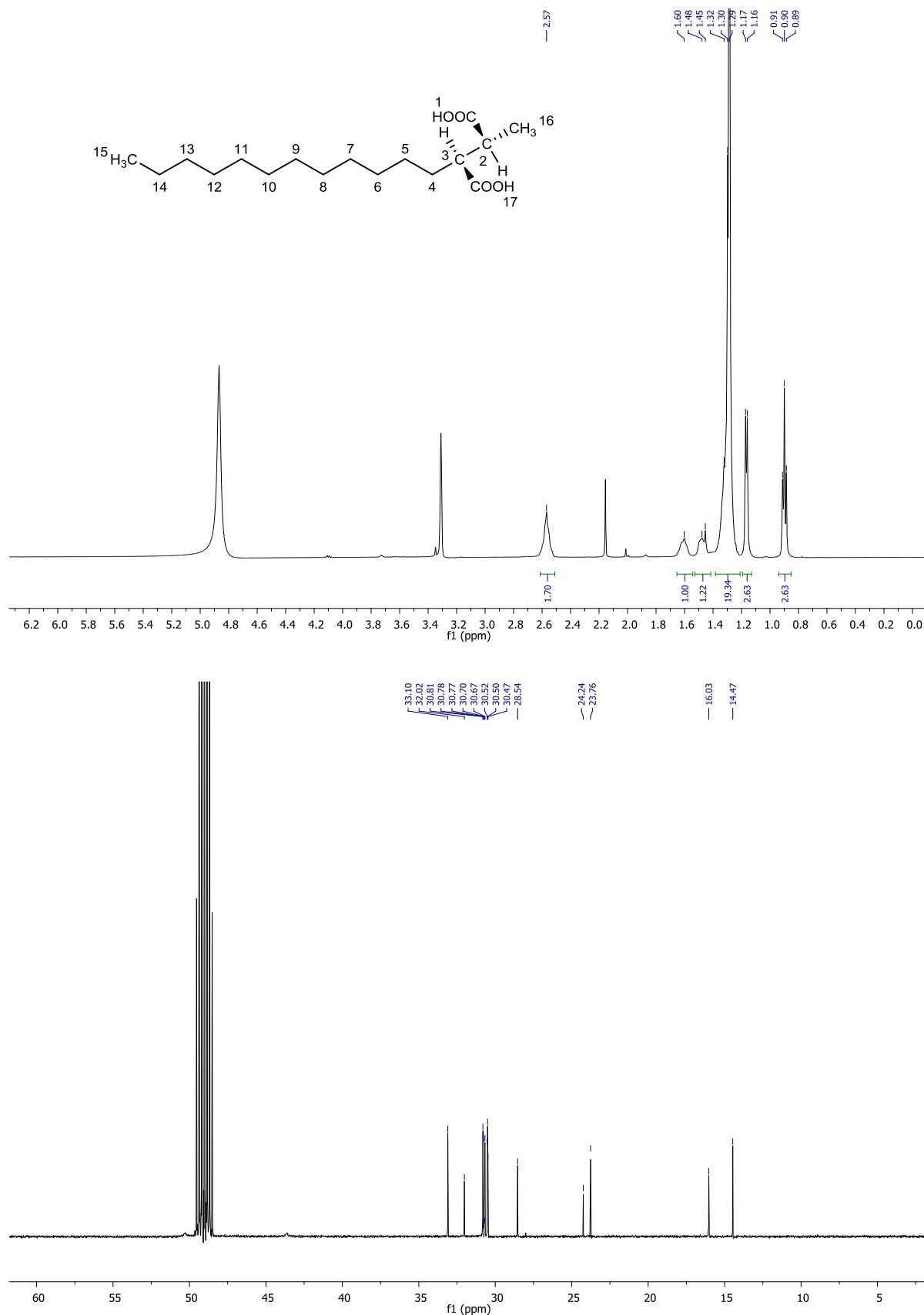
**Annexe 6 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz) du montagnétol dans le  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$**



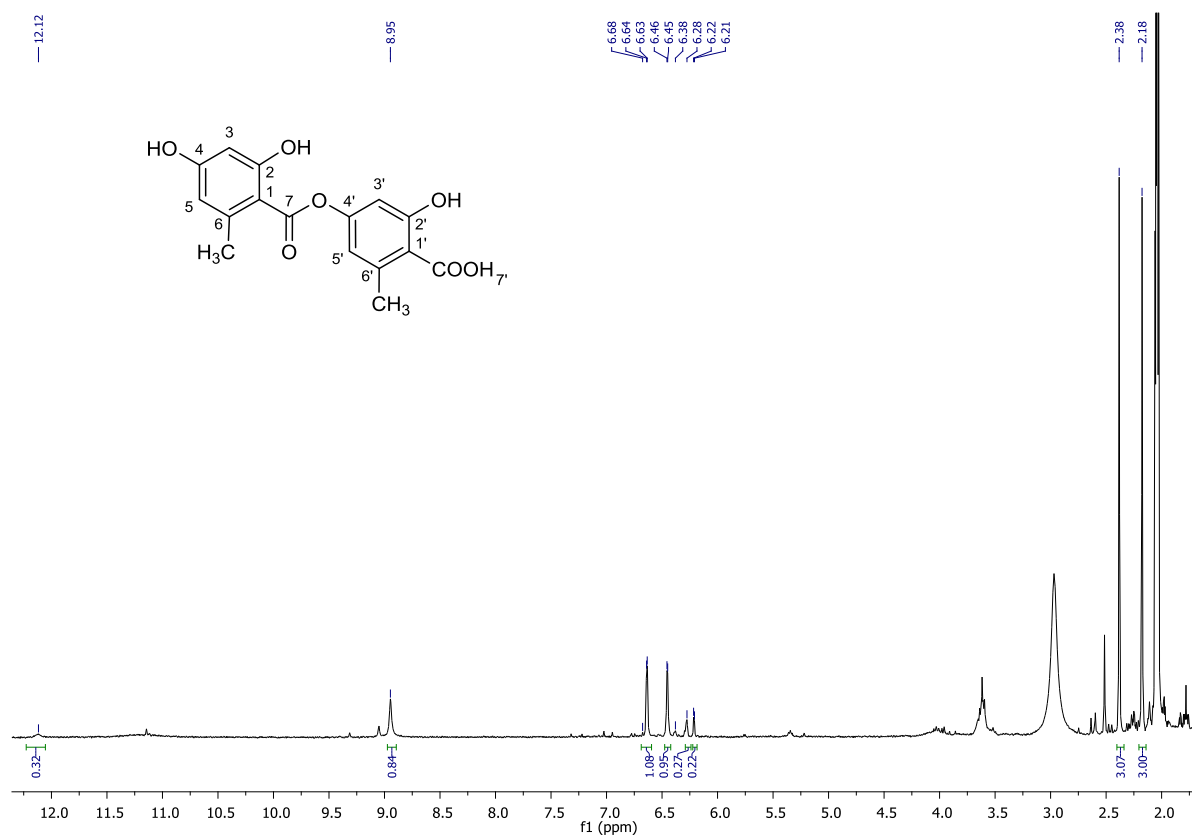
**Annexe 7 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz) de l'orsellinate de méthyle dans le  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$** 



**Annexe 8 : Spectres RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) de l'acide roccellique dans le  $\text{CD}_3\text{OD}$**



**Annexe 9 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz) de l'acide lécanorique dans le  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$**



**Annexe 10 : Liste des différentes souches bactériennes isolées de quatre lichens selon les conditions de culture : milieu (MA: Marine Agar media, AIA: Actinomycetes Isolation Agar media et ISP2: International Streptomyces Project 2 Agar media) et leur localisation (lavage : Wash et Homogénat : Homogenate)**

\* en gras: pourcentage de similarité  $\leq 96$  %

Strain	Lichen	Environment	Media	Extracts	Length (pb)	Closest relative in Eztaxon server	% 16S*	Phylum/Class	Family
MOLA1501	<i>Lichina confinis</i>	Marine	MA	Homogenate	802	<i>Sphingomonas suberifaciens</i>	<b>95,39</b>	Alphaproteobacteria	Sphingomonadaceae
MOLA1487	<i>Lichina confinis</i>	Marine	AIA	Wash	778	<i>Saccharopolyspora gloriosae</i>	100,00	Actinobacteria	Pseudonocardiaceae
MOLA1509	<i>Lichina confinis</i>	Marine	AIA	Wash					
MOLA1499	<i>Lichina confinis</i>	Marine	MA	Wash	791	<i>Jannaschia pohangensis</i>	97,35	Alphaproteobacteria	Rhodobacteraceae
MOLA1443	<i>Lichina confinis</i>	Marine	MA	Homogenate					
MOLA1508	<i>Lichina confinis</i>	Marine	AIA	Homogenate	844	<i>Microbacterium aurantiacum</i>	98,71	Actinobacteria	Microbacteriaceae
MOLA1503	<i>Lichina confinis</i>	Marine	AIA	Homogenate					
MOLA1515	<i>Lichina confinis</i>	Marine	AIA	Wash	853	<i>Agromyces terreus</i>	97,26	Actinobacteria	Microbacteriaceae
MOLA1514	<i>Lichina confinis</i>	Marine	AIA	Wash	807	<i>Blastomonas natatoria</i>	<b>95,26</b>	Alphaproteobacteria	Sphingomonadaceae
MOLA1512	<i>Lichina confinis</i>	Marine	AIA	Homogenate	840	<i>Paraoskovia marina</i>	97,98	Actinobacteria	Cellulomonadaceae
MOLA1486	<i>Lichina confinis</i>	Marine	AIA	Wash	829	<i>Microbacterium foliorum</i>	99,39	Actinobacteria	Microbacteriaceae
MOLA1466	<i>Lichina confinis</i>	Marine	MA	Wash	786	<i>Sulfitobacter marinus</i>	99,22	Alphaproteobacteria	Rhodobacteraceae
MOLA1498	<i>Lichina confinis</i>	Marine	MA	Wash	799	<i>Maribius pelagius</i>	<b>95,42</b>	Alphaproteobacteria	Rhodobacteraceae
MOLA1497	<i>Lichina confinis</i>	Marine	MA	Wash	833	<i>Lewinella persica</i>	<b>94,33</b>	Alphaproteobacteria	Saprospiraceae
MOLA1495	<i>Lichina confinis</i>	Marine	MA	Wash	809	<i>Sulfitobacter brevis</i>	98,85	Alphaproteobacteria	Rhodobacteraceae
MOLA1494	<i>Lichina confinis</i>	Marine	MA	Wash					
MOLA1488	<i>Lichina confinis</i>	Marine	AIA	Wash	826	<i>Streptomyces cyaneofuscatus</i>	100,00	Actinobacteria	Streptomycetaceae
MOLA1493	<i>Lichina confinis</i>	Marine	AIA	Wash					
MOLA1492	<i>Lichina confinis</i>	Marine	AIA	Wash	824	<i>Streptomyces carpaticus</i>	100,00	Actinobacteria	Streptomycetaceae
MOLA1491	<i>Lichina confinis</i>	Marine	AIA	Wash	832	<i>Kocuria rhizophila</i>	99,51	Actinobacteria	Micrococcaceae
MOLA1490	<i>Lichina confinis</i>	Marine	AIA	Wash	819	<i>Micrococcus antarcticus</i>	98,90	Actinobacteria	Micrococcaceae
MOLA1489	<i>Lichina confinis</i>	Marine	AIA	Wash	672	<i>Arthrobacter crystallopoietes</i>	97,72	Actinobacteria	Micrococcaceae
MOLA1485	<i>Lichina confinis</i>	Marine	AIA	Wash	828	<i>Bacillus simplex</i>	100,00	Firmicutes	Bacillaceae
MOLA1484	<i>Lichina confinis</i>	Marine	AIA	Homogenate	812	<i>Streptomyces anulatus</i>	99,88	Actinobacteria	Streptomycetaceae
MOLA1464	<i>Lichina confinis</i>	Marine	MA	Wash	805	<i>Sphingomonas suberifaciens</i>	<b>95,90</b>	Alphaproteobacteria	Sphingomonadaceae
MOLA1465	<i>Lichina confinis</i>	Marine	MA	Wash					
MOLA1463	<i>Lichina confinis</i>	Marine	MA	Wash					
MOLA1457	<i>Lichina confinis</i>	Marine	MA	Wash	795	<i>Sulfitobacter brevis</i>	99,09	Alphaproteobacteria	Rhodobacteraceae
MOLA1458	<i>Lichina confinis</i>	Marine	MA	Wash					

Annexe 10 (suite)									
<b>MOLA1461</b>	<i>Lichina confinis</i>	Marine	MA	Wash	793				
<b>MOLA1462</b>	<i>Lichina confinis</i>	Marine	MA	Wash		<i>Erythrobacter citreus</i>	98,59	Alphaproteobacteria	Erythrobacteraceae
<b>MOLA1460</b>	<i>Lichina confinis</i>	Marine	MA	Wash					
<b>MOLA 1449</b>	<i>Lichina confinis</i>	Marine	MA	Homogenate					
<b>MOLA1456</b>	<i>Lichina confinis</i>	Marine	MA	Wash	620	<i>Porphyrobacter sanguineus</i>	97,09	Alphaproteobacteria	Erythrobacteraceae
<b>MOLA1451</b>	<i>Lichina confinis</i>	Marine	MA	Homogenate	793				
<b>MOLA1452</b>	<i>Lichina confinis</i>	Marine	MA	Wash		<i>Sphingomicrobium lutaoense</i>	<b>93,44</b>	Alphaproteobacteria	Rhodobacteraceae
<b>MOLA1453</b>	<i>Lichina confinis</i>	Marine	MA	Wash					
<b>MOLA1454</b>	<i>Lichina confinis</i>	Marine	MA	Wash					
<b>MOLA1447</b>	<i>Lichina confinis</i>	Marine	MA	Homogenate	823	<i>Paraorskovia marina</i>	98,30	Actinobacteria	Cellulomonadaceae
<b>MOLA1439</b>	<i>Lichina confinis</i>	Marine	MA	Homogenate					
<b>MOLA1437</b>	<i>Lichina confinis</i>	Marine	MA	Homogenate		<i>Paracoccus marcusii</i>	98,61	Alphaproteobacteria	Paracoccaceae
<b>MOLA1500</b>	<i>Lichina confinis</i>	Marine	MA	Homogenate					
<b>MOLA1438</b>	<i>Lichina confinis</i>	Marine	MA	Homogenate	793				
<b>MOLA1450</b>	<i>Lichina confinis</i>	Marine	MA	Homogenate	831	<i>Cellulosimicrobium terreum</i>	97,93	Actinobacteria	Promicromonosporaceae
<b>MOLA1448</b>	<i>Lichina confinis</i>	Marine	MA	Homogenate	839	<i>Nocardoides mesophilus</i>	<b>95,04</b>	Actinobacteria	Nocardioidaceae
<b>MOLA1446</b>	<i>Lichina confinis</i>	Marine	MA	Homogenate	849	<i>Marmoricola aequoreus</i>	98,40	Actinobacteria	Nocardioidaceae
<b>MOLA1445</b>	<i>Lichina confinis</i>	Marine	MA	Homogenate	838	<i>Micrococcus luteus</i>	99,88	Actinobacteria	Micrococcaceae
<b>MOLA1442</b>	<i>Lichina confinis</i>	Marine	MA	Homogenate	794	<i>Litoreibacter janthinus</i>	<b>95,34</b>	Alphaproteobacteria	Rhodobacteraceae
<b>MOLA1502</b>	<i>Lichina confinis</i>	Marine	MA	Homogenate					
<b>MOLA1441</b>	<i>Lichina confinis</i>	Marine	MA	Homogenate	847	<i>Agromyces terreus</i>	<b>96,04</b>	Actinobacteria	Microbacteriaceae
<b>MOLA1513</b>	<i>Lichina confinis</i>	Marine	AIA	Homogenate					
<b>MOLA1440</b>	<i>Lichina confinis</i>	Marine	MA	Homogenate	804	<i>Litoreibacter janthinus</i>	<b>94,76</b>	Alphaproteobacteria	Rhodobacteraceae
<b>MOLA1455</b>	<i>Lichina confinis</i>	Marine	MA	Wash	798	<i>Novosphingobium pentaromativorans</i>	<b>93,60</b>	Alphaproteobacteria	Sphingomonadaceae
<b>MOLA1496</b>	<i>Lichina confinis</i>	Marine	MA	Wash	818	<i>Sphingomonas adhaesiva</i>	<b>96,03</b>	Alphaproteobacteria	Sphingomonadaceae
<b>MOLA1444</b>	<i>Lichina confinis</i>	Marine	MA	Homogenate	842	<i>Brevibacterium epidermidis</i>	98,42	Actinobacteria	Brevibacteriaceae
<b>MOLA1436</b>	<i>Lichina pygmaea</i>	Marine	MA	Wash	797	<i>Sulfitobacter brevis Ekho</i>	98,86	Alphaproteobacteria	Rhodobacteraceae
<b>MOLA1434</b>	<i>Lichina pygmaea</i>	Marine	MA	Wash	833	<i>Marmoricola aequoreus</i>	98,39	Actinobacteria	Nocardioidaceae
<b>MOLA1433</b>	<i>Lichina pygmaea</i>	Marine	MA	Homogenate	793				
<b>MOLA1411</b>	<i>Lichina pygmaea</i>	Marine	MA	Wash	793	<i>Loktanella hongkongensis</i>	99,48	Alphaproteobacteria	Rhodobacteraceae
<b>MOLA1435</b>	<i>Lichina pygmaea</i>	Marine	MA	Wash	836	<i>Brevibacterium picturae</i>	99,52	Actinobacteria	Brevibacteriaceae
<b>MOLA1432</b>	<i>Lichina pygmaea</i>	Marine	MA	Homogenate	867	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100,00	Firmicutes	Staphylococcaceae

Annexe 10 (suite)									
<b>MOLA1510</b>	<i>Lichina pygmaea</i>	Marine	MA	Homogenate	802				
<b>MOLA1416</b>	<i>Lichina pygmaea</i>	Marine	MA	Homogenate					
<b>MOLA1507</b>	<i>Lichina pygmaea</i>	Marine	MA	Homogenate					
<b>MOLA1504</b>	<i>Lichina pygmaea</i>	Marine	MA	Homogenate		<i>Hoeflea phototrophica</i>	<b>91,90</b>	Alphaproteobacteria	Phyllobacteriaceae
<b>MOLA1505</b>	<i>Lichina pygmaea</i>	Marine	MA	Homogenate					
<b>MOLA1415</b>	<i>Lichina pygmaea</i>	Marine	MA	Homogenate					
<b>MOLA1511</b>	<i>Lichina pygmaea</i>	Marine	MA	Homogenate					
<b>MOLA1427</b>	<i>Lichina pygmaea</i>	Marine	AIA	Homogenate	829	<i>Streptomyces cyaneofuscatus</i>	100,00	Actinobacteria	Streptomycetaceae
<b>MOLA1426</b>	<i>Lichina pygmaea</i>	Marine	AIA	Homogenate	865	<i>Bacillus subtilis subsp. inaquosorum</i>	99,87	Firmicutes	Bacillaceae
<b>MOLA1425</b>	<i>Lichina pygmaea</i>	Marine	MA	Homogenate	829	<i>Streptomyces somaliensis</i>	100,00	Actinobacteria	Streptomycetaceae
<b>MOLA1405</b>	<i>Lichina pygmaea</i>	Marine	AIA	Homogenate					
<b>MOLA1424</b>	<i>Lichina pygmaea</i>	Marine	MA	Homogenate	866	<i>Bacillus aryabhatai</i>	99,65	Firmicutes	Bacillaceae
<b>MOLA1423</b>	<i>Lichina pygmaea</i>	Marine	MA	Homogenate	695				
<b>MOLA1422</b>	<i>Lichina pygmaea</i>	Marine	MA	Homogenate		<i>Bacillus licheniformis</i>	99,71	Firmicutes	Bacillaceae
<b>MOLA1421</b>	<i>Lichina pygmaea</i>	Marine	MA	Homogenate	815				
<b>MOLA1420</b>	<i>Lichina pygmaea</i>	Marine	MA	Homogenate		<i>Streptomyces cyaneofuscatus</i>	99,88	Actinobacteria	Streptomycetaceae
<b>MOLA1419</b>	<i>Lichina pygmaea</i>	Marine	MA	Homogenate	825	<i>Halobacillus locisalis</i>	99,64	Firmicutes	Bacillaceae
<b>MOLA1418</b>	<i>Lichina pygmaea</i>	Marine	MA	Homogenate	814	<i>Micrococcus luteus</i>	99,88	Actinobacteria	Micrococcaceae
<b>MOLA1417</b>	<i>Lichina pygmaea</i>	Marine	MA	Homogenate	777	<i>Erythrobacter citreus</i>	98,84	Alphaproteobacteria	Erythrobacteraceae
<b>MOLA1409</b>	<i>Lichina pygmaea</i>	Marine	MA	Wash	860				
<b>MOLA1410</b>	<i>Lichina pygmaea</i>	Marine	MA	Wash		<i>Bacillus hwajinpoensis</i>	99,42	Firmicutes	Bacillaceae
<b>MOLA1412</b>	<i>Lichina pygmaea</i>	Marine	MA	Wash					
<b>MOLA1408</b>	<i>Lichina pygmaea</i>	Marine	AIA	Homogenate	824	<i>Streptomyces globisporus subsp. globisporus</i>	100,00	Actinobacteria	Streptomycetaceae
<b>MOLA1407</b>	<i>Lichina pygmaea</i>	Marine	AIA	Homogenate	831	<i>Salinibacterium amurskyense</i>	100,00	Actinobacteria	Microbacteriaceae
<b>MOLA1406</b>	<i>Lichina pygmaea</i>	Marine	AIA	Homogenate	824	<i>Streptomyces anulatus</i>	100,00	Actinobacteria	Streptomycetaceae
<b>MOLA1431</b>	<i>Lichina pygmaea</i>	Marine	MA	Homogenate	798	<i>Erythrobacter citreus</i>	98,10	Alphaproteobacteria	Erythrobacteraceae
<b>MOLA1429</b>	<i>Lichina pygmaea</i>	Marine	MA	Homogenate	801	<i>Altererythrobacter namhicola</i>	98,63	Alphaproteobacteria	Erythrobacteraceae
<b>MOLA1414</b>	<i>Lichina pygmaea</i>	Marine	MA	Homogenate	862				
<b>MOLA1413</b>	<i>Lichina pygmaea</i>	Marine	MA	Homogenate	627	<i>Planococcus maritimus</i>	99,65	Firmicutes	Planococcaceae
<b>MOLA1506</b>	<i>Lichina pygmaea</i>	Marine	MA	Homogenate	824	<i>Microbacterium kitamiense</i>	98,79	Actinobacteria	Microbacteriaceae
<b>MOLA1430</b>	<i>Lichina pygmaea</i>	Marine	AIA	Homogenate	806	<i>Altererythrobacter namhicola</i>	98,24	Alphaproteobacteria	Erythrobacteraceae

Annexe 10 (suite)									
<b>MOLA1551</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	MA	Wash	801	<i>Phenylobacterium haematophilum</i>	98,21	Alphaproteobacteria	Caulobacteraceae
<b>MOLA1548</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	MA	Wash	825	<i>Microbacterium kitamiense</i>	96,72	Actinobacteria	Microbacteriaceae
<b>MOLA1545</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	MA	Wash	829	<i>Microbacterium pumilum</i>	99,88	Actinobacteria	Microbacteriaceae
<b>MOLA1544</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	MA	Wash	826	<i>Cellulosimicrobium terreum</i>	97,93	Actinobacteria	Promicromonosporaceae
<b>MOLA1542</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	MA	Wash	803	<i>Paracoccus yeei</i>	98,26	Alphaproteobacteria	Paraccocaceae
<b>MOLA1535</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	MA	Wash					
<b>MOLA1540</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	MA	Wash	789	<i>Oceanobacillus profundus</i>	99,36	Firmicutes	Bacillaceae
<b>MOLA1538</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	MA	Wash	830	<i>Aeromicrobium tamlense</i>	97,75	Actinobacteria	Nocardioidaceae
<b>MOLA1536</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	MA	Wash	826	<i>Paraoskovia marina</i>	98,29	Actinobacteria	Cellulomonadaceae
<b>MOLA1534</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	MA	Wash	829	<i>Paraoskovia marina</i>	98,43	Actinobacteria	Cellulomonadaceae
<b>MOLA1533</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	MA	Wash					
<b>MOLA1530</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	MA	Wash	827	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i>	99,15	Actinobacteria	Mycobacteriaceae
<b>MOLA1529</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	MA	Wash	792	<i>Mesorhizobium ciceri</i>	97,84	Alphaproteobacteria	Phyllobacteriaceae
<b>MOLA1528</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	MA	Wash	830	<i>Paraoskovia marina</i>	98,43	Actinobacteria	Cellulomonadaceae
<b>MOLA1524</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	MA	Wash	831	<i>Microbacterium lacus</i>	98,20	Actinobacteria	Microbacteriaceae
<b>MOLA1525</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	MA	Wash					
<b>MOLA1522</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	MA	Wash		<i>Nocardioides mesophilus</i>	<b>94,91</b>	Actinobacteria	Nocardioidaceae
<b>MOLA1523</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	MA	Wash	828				
<b>MOLA1521</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	MA	Wash		<i>Nocardioides mesophilus</i>	<b>94,86</b>	Actinobacteria	Nocardioidaceae
<b>MOLA1599</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	MA	Homogenate	831				
<b>MOLA1553</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	MA	Homogenate	836				
<b>MOLA1520</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	MA	Wash					
<b>MOLA1519</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	MA	Wash		<i>Cellulosimicrobium terreum</i>	97,82	Actinobacteria	Promicromonosporaceae
<b>MOLA1561</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	MA	Homogenate					
<b>MOLA1572</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	MA	Homogenate					
<b>MOLA1518</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	MA	Wash	826	<i>Isoptericola nanjingensis</i>	99,00	Actinobacteria	Promicromonosporaceae
<b>MOLA1517</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	MA	Wash					
<b>MOLA1516</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	MA	Wash	822	<i>Streptomyces tateyamensis</i>	99,76	Actinobacteria	Streptomycetaceae
<b>MOLA1597</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	AIA	Wash	835	<i>Agromyces terreus</i>	99,27	Actinobacteria	Microbacteriaceae
<b>MOLA1593</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	AIA	Homogenate	771	<i>Gordonia hankookensis</i>	97,27	Actinobacteria	Gordoniaceae
<b>MOLA1590</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	AIA	Homogenate	833	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	99,76	Actinobacteria	Microbacteriaceae
<b>MOLA1589</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	AIA	Homogenate	832	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	100,00	Actinobacteria	Microbacteriaceae

Annexe 10 (suite)									
<b>MOLA1588</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	AIA	Homogenate	734	<i>Mycobacterium flavescens</i>	98,58	Actinobacteria	Mycobacteriaceae
<b>MOLA1554</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	MA	Homogenate	838				
<b>MOLA1555</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	MA	Homogenate					
<b>MOLA1526</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	MA	Wash					
<b>MOLA1527</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	MA	Wash		<i>Paraoerskovia marina</i>	98,07	Actinobacteria	Cellulomonadaceae
<b>MOLA1585</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	AIA	Homogenate					
<b>MOLA1592</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	AIA	Homogenate					
<b>MOLA1595</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	MA	Wash					
<b>MOLA1602</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	AIA	Homogenate					
<b>MOLA1584</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	AIA	Homogenate	829	<i>Microbacterium kitamiense</i>	97,71	Actinobacteria	Microbacteriaceae
<b>MOLA1594</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	AIA	Homogenate					
<b>MOLA1583</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	AIA	Homogenate					
<b>MOLA1591</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	AIA	Homogenate		<i>Gordonia hankookensis</i>	99,88	Actinobacteria	Gordoniaceae
<b>MOLA1587</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	AIA	Homogenate	844				
<b>MOLA1586</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	AIA	Homogenate					
<b>MOLA1582</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	AIA	Homogenate	823	<i>Gordonia defluvii</i>	98,42	Actinobacteria	Gordoniaceae
<b>MOLA1531</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	MA	Wash					
<b>MOLA1580</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	AIA	Homogenate	831	<i>Isoptericola nanjingensis</i>	99,63	Actinobacteria	Promicromonosporaceae
<b>MOLA1579</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	AIA	Homogenate	819	<i>Streptomyces drozdowiczii</i>	98,89	Actinobacteria	Streptomycetaceae
<b>MOLA1578</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	AIA	Homogenate					
<b>MOLA1596</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	AIA	Wash					
<b>MOLA1611</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	AIA	Wash		<i>Streptomyces cyaneofuscatus</i>	100,00	Actinobacteria	Streptomycetaceae
<b>MOLA1612</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	AIA	Wash					
<b>MOLA1615</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	AIA	Wash	839				
<b>MOLA1614</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	AIA	Wash					
<b>MOLA1577</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	MA	Wash	833	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100,00	Firmicutes	Staphylococcaceae
<b>MOLA1576</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	MA	Wash	830	<i>Paraoerskovia marina</i>	98,19	Actinobacteria	Cellulomonadaceae
<b>MOLA1575</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	MA	Homogenate		<i>Micrococcus yunnanensis</i>	99,75	Actinobacteria	Micrococcaceae
<b>MOLA1608</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	MA	Wash	841				
<b>MOLA1574</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	MA	Homogenate	829	<i>Paraoerskovia marina</i>	98,19	Actinobacteria	Cellulomonadaceae
<b>MOLA1573</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	MA	Homogenate	819	<i>Cellulosimicrobium terreum</i>	97,80	Actinobacteria	Promicromonosporaceae
<b>MOLA1570</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	MA	Homogenate	836	<i>Agromyces terreus</i>	97,58	Actinobacteria	Microbacteriaceae
<b>MOLA1569</b>	<i>Roccella fuciformis</i>	Maritime	MA	Homogenate	834	<i>Brevibacterium epidermidis</i>	98,53	Actinobacteria	Brevibacteriaceae

Annexe 10 (suite)								
<b>MOLA1567</b>	<i>Rocella fuciformis</i>	Maritime	MA	Homogenate	829			
<b>MOLA1566</b>	<i>Rocella fuciformis</i>	Maritime	MA	Homogenate		<i>Microbacterium oleivorans</i>	98,31	Actinobacteria Microbacteriaceae
<b>MOLA1564</b>	<i>Rocella fuciformis</i>	Maritime	MA	Homogenate				
<b>MOLA1565</b>	<i>Rocella fuciformis</i>	Maritime	MA	Homogenate	821	<i>Brevibacterium epidermidis</i>	98,40	Actinobacteria Brevibacteriaceae
<b>MOLA1563</b>	<i>Rocella fuciformis</i>	Maritime	MA	Homogenate	839			
<b>MOLA1549</b>	<i>Rocella fuciformis</i>	Maritime	MA	Wash		<i>Paraoerskovia marina</i>	98,07	Actinobacteria Cellulomonadaceae
<b>MOLA1537</b>	<i>Rocella fuciformis</i>	Maritime	MA	Wash				
<b>MOLA1562</b>	<i>Rocella fuciformis</i>	Maritime	MA	Homogenate	829	<i>Microbacterium esteraromaticum</i>	97,79	Actinobacteria Microbacteriaceae
<b>MOLA1560</b>	<i>Rocella fuciformis</i>	Maritime	MA	Homogenate	838	<i>Paraoerskovia marina</i>	97,85	Actinobacteria Cellulomonadaceae
<b>MOLA1559</b>	<i>Rocella fuciformis</i>	Maritime	MA	Homogenate	830			
<b>MOLA1546</b>	<i>Rocella fuciformis</i>	Maritime	MA	Wash		<i>Paraoerskovia marina</i>	98,19	Actinobacteria Cellulomonadaceae
<b>MOLA1558</b>	<i>Rocella fuciformis</i>	Maritime	MA	Homogenate				
<b>MOLA1557</b>	<i>Rocella fuciformis</i>	Maritime	MA	Homogenate	833	<i>Aeromicrobium erythreum</i>	<b>93,91</b>	Actinobacteria Nocardiodaceae
<b>MOLA1556</b>	<i>Rocella fuciformis</i>	Maritime	MA	Homogenate				
<b>MOLA1550</b>	<i>Rocella fuciformis</i>	Maritime	MA	Wash		<i>Microbacterium invictum</i>	99,64	Actinobacteria Microbacteriaceae
<b>MOLA1541</b>	<i>Rocella fuciformis</i>	Maritime	MA	Wash				
<b>MOLA1571</b>	<i>Rocella fuciformis</i>	Maritime	MA	Homogenate	836			
<b>MOLA1605</b>	<i>Rocella fuciformis</i>	Maritime	AIA	Wash	838	<i>Isoptericola nanjingensis</i>	98,77	Actinobacteria Promicromonosporaceae
<b>MOLA1532</b>	<i>Rocella fuciformis</i>	Maritime	MA	Wash				
<b>MOLA1603</b>	<i>Rocella fuciformis</i>	Maritime	AIA	Homogenate	825	<i>Streptomyces drozdowiczii</i>	99,51	Actinobacteria Streptomycetaceae
<b>MOLA1601</b>	<i>Rocella fuciformis</i>	Maritime	AIA	Homogenate	845			
<b>MOLA1598</b>	<i>Rocella fuciformis</i>	Maritime	MA	Homogenate		<i>Agromyces terreus</i>	100,00	Actinobacteria Microbacteriaceae
<b>MOLA1600</b>	<i>Rocella fuciformis</i>	Maritime	AIA	Homogenate		<i>Streptomyces atroolivaceus</i>	99,63	Actinobacteria Streptomycetaceae
<b>MOLA1610</b>	<i>Rocella fuciformis</i>	Maritime	AIA	Wash	830			
<b>MOLA1606</b>	<i>Rocella fuciformis</i>	Maritime	MA	Wash	774	<i>Microbacterium deminutum</i>	98,41	Actinobacteria Microbacteriaceae
<b>MOLA1617</b>	<i>Rocella fuciformis</i>	Maritime	AIA	Homogenate	664	<i>Streptomyces albiacialis</i>	99,25	Actinobacteria Streptomycetaceae
<b>MOLA1616</b>	<i>Rocella fuciformis</i>	Maritime	AIA	Homogenate	835	<i>Paraoerskovia marina</i>	97,93	Actinobacteria Cellulomonadaceae
<b>MOLA1607</b>	<i>Rocella fuciformis</i>	Maritime	AIA	Wash	845	<i>Nocardioides albus</i>	99,76	Actinobacteria Nocardiodaceae
<b>MOLA1568</b>	<i>Rocella fuciformis</i>	Maritime	MA	Homogenate	829	<i>Brevibacterium epidermidis</i>	99,63	Actinobacteria Brevibacteriaceae
<b>DP94</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Homogenate	874	<i>Nocardia ignorata</i>	98,59	Actinobacteria Nocardiodaceae
<b>DP88</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Homogenate	930	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	99,31	Firmicutes Bacillaceae
<b>DP85</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Homogenate	870	<i>Streptomyces xanthophaeus</i>	99,05	Actinobacteria Streptomycetaceae



Annexe 10 (suite)									
<b>DP83</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Homogenate	917	<i>Pseudomonas mohnii</i>	99,18	Gammaproteobacteria	Pseudomonadaceae
<b>DP82</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Homogenate	899	<i>Arthrobacter nicotinovorans</i>	97,79	Actinobacteria	Micrococcaceae
<b>DP79</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Homogenate	894	<i>Pseudomonas mohnii</i>	99,18	Gammaproteobacteria	Pseudomonadaceae
<b>DP63</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Wash	822	<i>Streptomyces xanthophaeus</i>	<b>95,94</b>	Actinobacteria	Streptomycetaceae
<b>DP61</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Wash	906	<i>Chryseobacterium aquaticum</i>	<b>96,71</b>	Alphaproteobacteria	Flavobacteriaceae
<b>DP60</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Wash	905	<i>Duganella violaceinigra</i>	97,14	Betaproteobacteria	Oxalobacteraceae
<b>DP54</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Wash	944	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	98,84	Firmicutes	Bacillaceae
<b>DP29</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Wash	905	<i>Pseudomonas arsenicoxydans</i>	99,20	Gammaproteobacteria	Pseudomonadaceae
<b>DP15</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Wash	915	<i>Streptomyces spororaveus</i>	98,03	Actinobacteria	Streptomycetaceae
<b>DP7</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Wash	842	<i>Sphingomonas melonis</i>	97,42	Alphaproteobacteria	Sphingomonadaceae
<b>DP4</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Wash	848	<i>Sphingomonas melonis</i>	98,28	Alphaproteobacteria	Sphingomonadaceae
<b>DP1</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Wash	876	<i>Streptomyces spororaveus</i>	98,59	Actinobacteria	Streptomycetaceae
<b>DP95</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Homogenate	822	<i>Nocardia ninae</i>	99,25	Actinobacteria	Nocardioidaceae
<b>DP93</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Homogenate	842	<i>Massilia albidiflava</i>	<b>96,76</b>	Betaproteobacteria	Oxalobacteraceae
<b>DP43</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Wash					
<b>DP92</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Homogenate	837	<i>Agromyces terreus</i>	99,04	Actinobacteria	Microbacteriaceae
<b>DP81</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Homogenate	854	<i>Pseudomonas mohnii</i>	99,88	Gammaproteobacteria	Pseudomonadaceae
<b>DP80</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Homogenate	829	<i>Variovorax ginsengisoli</i>	<b>96,98</b>	Betaproteobacteria	Comamonadaceae
<b>DP75</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Homogenate	853	<i>Acidovorax defluvii</i>	99,06	Betaproteobacteria	Comamonadaceae
<b>DP20</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Wash					
<b>DP51</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Wash					
<b>DP73</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Homogenate	796	<i>Caulobacter henricii</i>	98,99	Alphaproteobacteria	Caulobacteraceae
<b>DP72</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Homogenate					
<b>DP71</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Homogenate	850	<i>Pseudomonas mandelii</i>	99,29	Gammaproteobacteria	Pseudomonadaceae
<b>DP32</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Wash					
<b>DP66</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Homogenate	838	<i>Pedobacter roseus</i>	100,00	Alphaproteobacteria	Sphingobacteriaceae
<b>DP62</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Wash	790	<i>Rhizobium rubi</i>	99,11	Alphaproteobacteria	Rhizobiaceae
<b>DP47</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Wash	838	<i>Pseudomonas mohnii</i>	100,00	Gammaproteobacteria	Pseudomonadaceae
<b>DP45</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Wash	863	<i>Pseudomonas mandelii</i>	99,52	Gammaproteobacteria	Pseudomonadaceae
<b>DP44</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Wash	822	<i>Arthrobacter nicotinovorans</i>	99,88	Actinobacteria	Micrococcaceae

Annexe 10 (suite)									
<b>DP41</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Wash	866	<i>Pseudomonas jessenii</i>	99,64	Gammaproteobacteria	Pseudomonadaceae
<b>DP38</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Wash	848				
<b>DP52</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Wash	846	<i>Pseudomonas mohnii</i>	99,76	Gammaproteobacteria	Pseudomonadaceae
<b>DP74</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Homogenate					
<b>DP69</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Homogenate					
<b>DP70</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Homogenate					
<b>DP46</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Wash					
<b>DP13</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Wash					
<b>DP3</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Wash					
<b>DP33</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Wash					
<b>DP48</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Wash					
<b>DP25</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Wash	828	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	99,76	Actinobacteria	Micrococcaceae
<b>DP24</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Wash	871	<i>Bacillus mycoides</i>	99,89	Firmicutes	Bacillaceae
<b>DP87</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Homogenate					
<b>DP16</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Wash					
<b>DP97</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Homogenate					
<b>DP53</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Wash					
<b>DP23</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Wash	808	<i>Sphingomonas melonis</i>	98,12	Alphaproteobacteria	Sphingomonadaceae
<b>DP5</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Wash					
<b>DP22</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Wash	841	<i>Massilia lutea</i>	<b>96,36</b>	Betaproteobacteria	Oxalobacteraceae
<b>DP18</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Wash	799	<i>Caulobacter henricii</i>	99,37	Alphaproteobacteria	Caulobacteraceae
<b>DP11</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Wash	863	<i>Pseudomonas baetica</i>	99,52	Gammaproteobacteria	Pseudomonadaceae
<b>DP49</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Wash					
<b>DP58</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Wash					
<b>DP30</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Wash					
<b>DP6</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Wash	807	<i>Sphingomonas melonis</i>	98,12	Gammaproteobacteria	Sphingomonadaceae
<b>DP2</b>	<i>Collema auriforme</i>	Inland	ISP2	Wash	845	<i>Pedobacter roseus</i>	97,76	Alphaproteobacteria	Sphingobacteriaceae

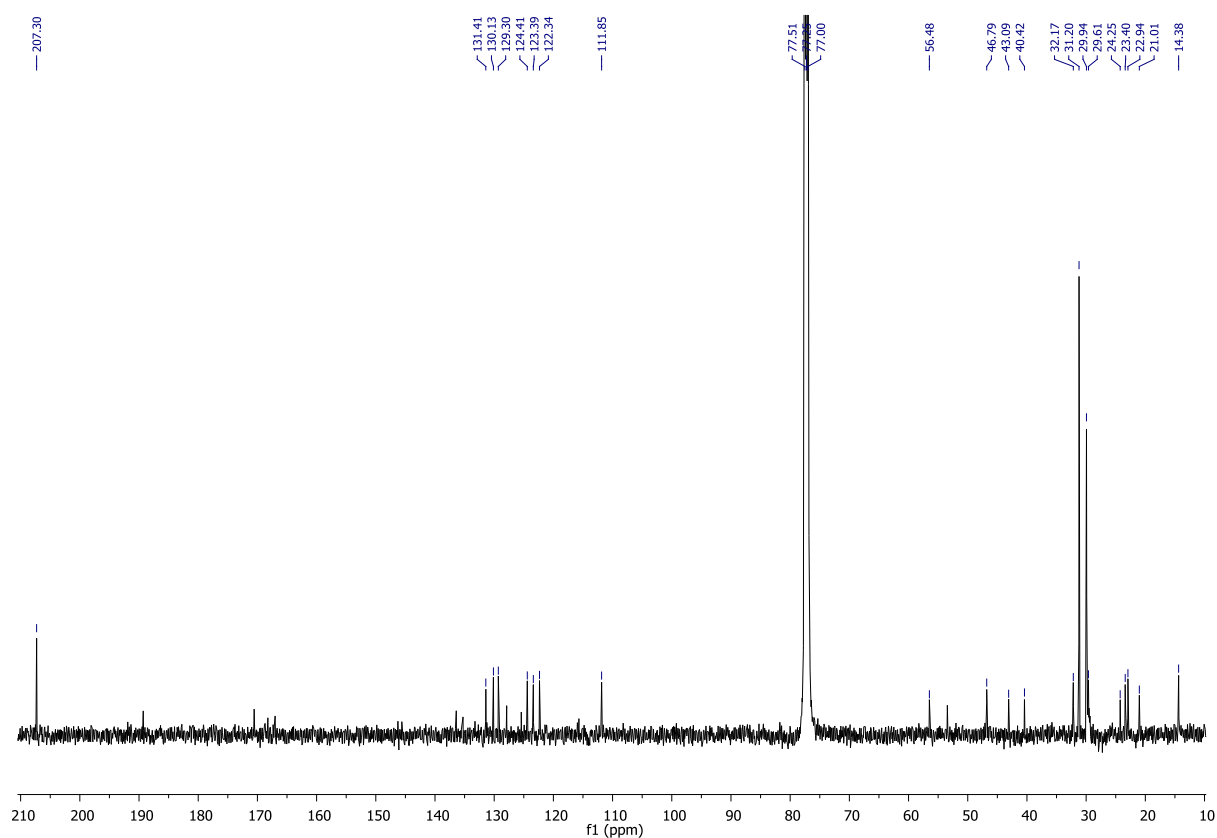
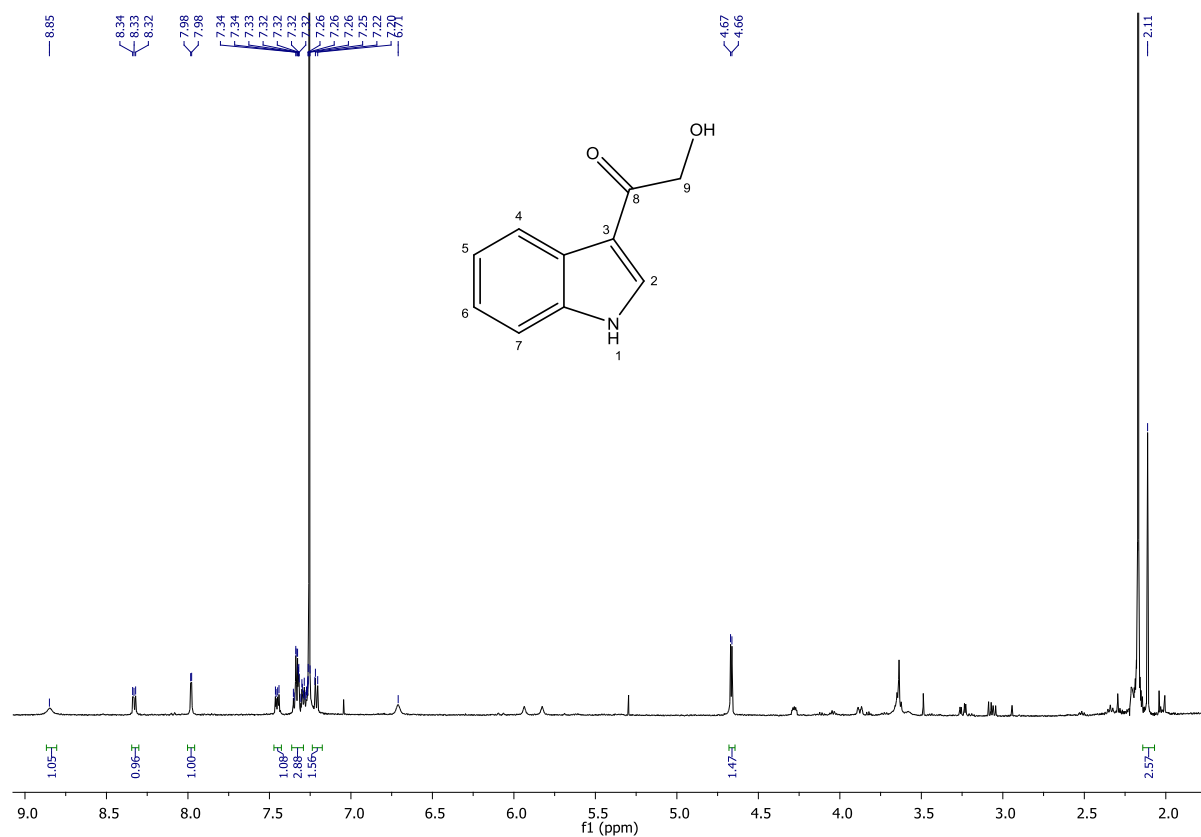
**Annexe 11 : Récapitulatif des OTUs des échantillons (construit avec Biom file)**

OTU ID	Taxonomie
24	Root; p__Proteobacteria; c__Alphaproteobacteria; f__Rhodobacteraceae
25	Root; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; f__Nocardoidaceae; g__ ; s__
26	Root; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; f__Microbacteriaceae; g__Microbacterium
27	Root; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; f__Promicromonosporaceae; g__Isoptricola; s__
21	Root; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; f__Micrococcaceae; g__Micrococcus; s__luteus
22	Root; p__Proteobacteria; c__Alphaproteobacteria; f__Rhodobacteraceae
28	Root; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; f__Pseudonocardiaceae; g__Saccharopolyspora; s__
29	Root; p__Proteobacteria; c__Alphaproteobacteria; f__Rhodobacteraceae; g__Paracoccus; s__aminovorans
8	Root; p__Proteobacteria; c__Alphaproteobacteria; f__Rhodobacteraceae; g__Paracoccus
59	Root; p__Firmicutes; c__Bacilli; f__Bacillaceae; g__ ; s__
58	Root; p__Proteobacteria; c__Alphaproteobacteria; f__Erythrobacteraceae; g__ ; s__
55	Root; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; f__Gordoniaceae; g__Gordonia; s__
54	Root; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; f__Mycobacteriaceae; g__Mycobacterium; s__
57	Root; p__Proteobacteria; c__Alphaproteobacteria; f__Erythrobacteraceae
51	Root; p__Firmicutes; c__Bacilli; f__Planococcaceae; g__Planococcus
50	Root; p__Proteobacteria; c__Alphaproteobacteria; f__Erythrobacteraceae
53	Root; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; f__Micrococcaceae
52	Root; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; f__Streptomyetaceae; g__ ; s__
89	Root; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; f__Microbacteriaceae; g__Microbacterium
83	Root; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; f__Streptomyetaceae; g__Streptomyces
87	Root; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; f__Microbacteriaceae; g__Microbacterium; s__
84	Root; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; f__Mycobacteriaceae; g__Mycobacterium; s__vaccae
85	Root; p__Firmicutes; c__Bacilli; f__Bacillaceae; g__Bacillus; s__muralis
3	Root; p__Proteobacteria; c__Alphaproteobacteria
7	Root; p__Proteobacteria; c__Alphaproteobacteria; f__Sphingomonadaceae; g__ ; s__
100	Root; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; f__Brevibacteriaceae; g__Brevibacterium; s__
39	Root; p__Proteobacteria; c__Alphaproteobacteria; f__Rhodobacteraceae; g__ ; s__
38	Root; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; f__Microbacteriaceae; g__Agromyces; s__
33	Root; p__Firmicutes; c__Bacilli; f__Staphylococcaceae; g__Staphylococcus; s__epidermidis
32	Root; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; f__Gordoniaceae; g__Gordonia; s__
31	Root; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; f__Streptomyetaceae; g__Streptomyces; s__
30	Root; p__Firmicutes; c__Bacilli; f__Bacillaceae; g__Bacillus; s__
37	Root; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; f__Microbacteriaceae; g__Microbacterium; s__aurum
36	Root; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; f__Microbacteriaceae; g__Microbacterium
61	Root; p__Proteobacteria; c__Alphaproteobacteria; f__Phyllobacteriaceae; g__ ; s__
62	Root; p__Proteobacteria; c__Alphaproteobacteria; f__Rhodobacteraceae; g__Anaerospora; s__hongkongensis
63	Root; p__Proteobacteria; c__Alphaproteobacteria; f__Erythrobacteraceae
64	Root; p__Proteobacteria; c__Alphaproteobacteria; f__Sphingomonadaceae; g__ ; s__
65	Root; p__Proteobacteria; c__Alphaproteobacteria; f__Rhodobacteraceae; g__ ; s__
66	Root; p__Proteobacteria; c__Alphaproteobacteria; f__Erythrobacteraceae; g__ ; s__
67	Root; p__Proteobacteria; c__Alphaproteobacteria; f__Caulobacteraceae; g__Phenylobacterium; s__
68	Root; p__Proteobacteria; c__Alphaproteobacteria; f__Sphingomonadaceae; g__ ; s__
2	Root; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; f__Cellulomonadaceae; g__ ; s__
6	Root; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; f__Gordoniaceae; g__Gordonia; s__
99	Root; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; f__Nocardoidaceae; g__ ; s__
98	Root; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; f__Microbacteriaceae; g__Microbacterium; s__
91	Root; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; f__Brevibacteriaceae; g__Brevibacterium; s__aureum
93	Root; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; f__Microbacteriaceae; g__Salinibacterium; s__amurskyense
92	Root; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; f__Nocardoidaceae; g__Aeromicrobium; s__
95	Root; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; f__Micrococcaceae; g__Kocuria; s__rhizophila
94	Root; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; f__Promicromonosporaceae

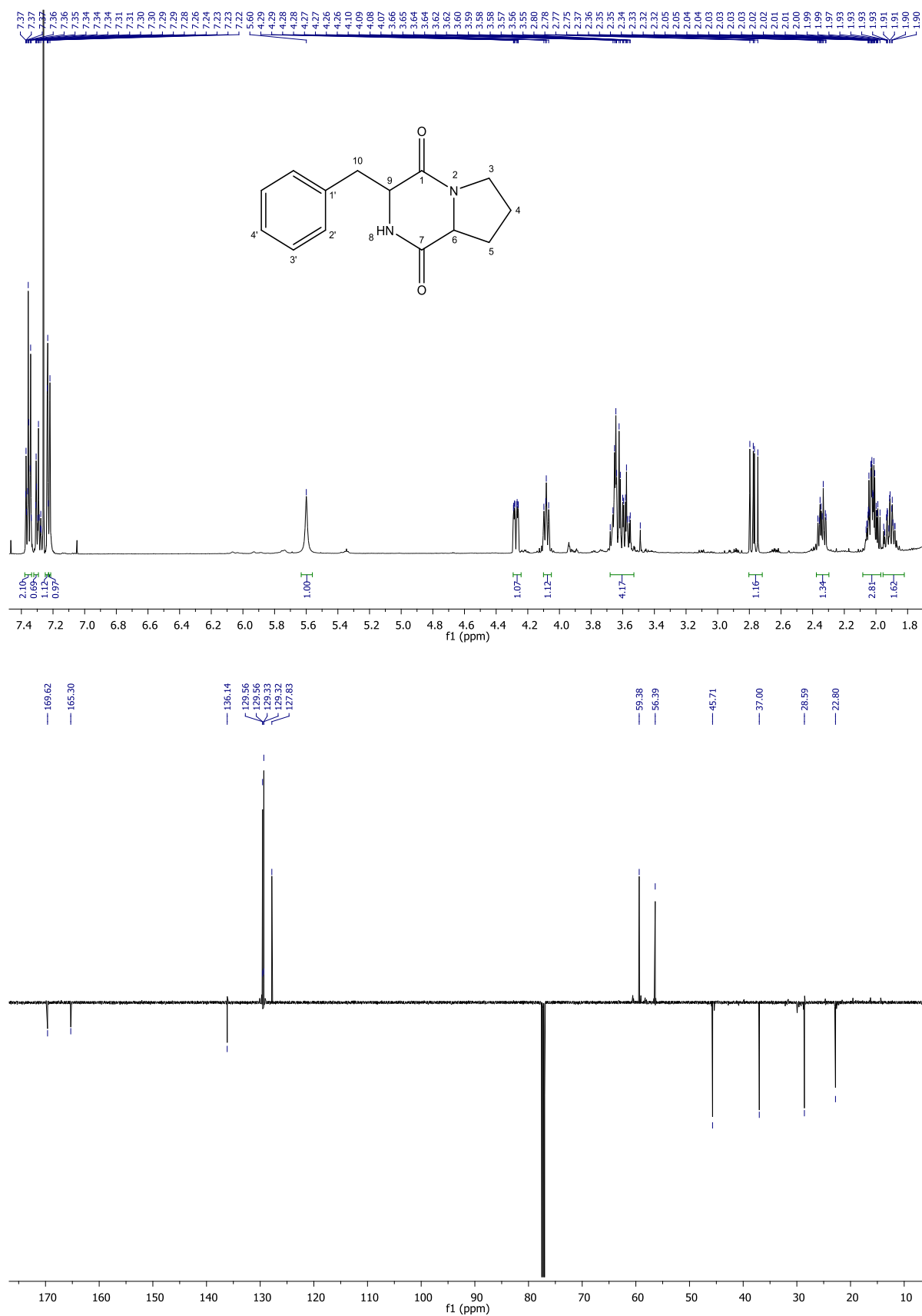
## Annexe 11 (suite)

97	Root; p__Bacteroidetes; c__Sphingobacteriia; f__Saprospiraceae; g__Lewinella; s__
96	Root; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; f__Microbacteriaceae; g__Curtobacterium; s__
11	Root; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; f__Cellulomonadaceae; g__; s__
13	Root; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; f__Microbacteriaceae; g__Microbacterium
12	Root; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; f__Microbacteriaceae; g__Microbacterium; s__
15	Root; p__Firmicutes; c__Bacilli; f__Bacillaceae; g__Bacillus; s__baekryungensis
14	Root; p__Proteobacteria; c__Alphaproteobacteria; f__Sphingomonadaceae; g__; s__
17	Root; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; f__Cellulomonadaceae; g__; s__
19	Root; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; f__Brevibacteriaceae; g__Brevibacterium; s__aureum
18	Root; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; f__Nocardoidaceae; g__; s__
48	Root; p__Firmicutes; c__Bacilli; f__Bacillaceae; g__; s__
49	Root; p__Proteobacteria; c__Alphaproteobacteria; f__Sphingomonadaceae; g__; s__
46	Root; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; f__Microbacteriaceae; g__Microbacterium
47	Root; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; f__Streptomycetaceae; g__; s__
44	Root; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; f__Streptomycetaceae; g__; s__
43	Root; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; f__Streptomycetaceae; g__Streptomyces
40	Root; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; f__Microbacteriaceae; g__Agromyces; s__
1	Root; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; f__Streptomycetaceae; g__Streptomyces
5	Root; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; f__Promicromonosporaceae; g__Cellulosimicrobium; s__
9	Root; p__Proteobacteria; c__Alphaproteobacteria; f__Erythrobacteraceae; g__; s__
75	Root; p__Firmicutes; c__Bacilli; f__Bacillaceae; g__Bacillus; s__flexus
74	Root; p__Firmicutes; c__Bacilli; f__Bacillaceae; g__Bacillus; s__
73	Root; p__Firmicutes; c__Bacilli; f__Planococcaceae; g__Planococcus; s__
72	Root; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; f__Microbacteriaceae; g__Agromyces; s__
70	Root; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; f__Nocardoidaceae; g__; s__

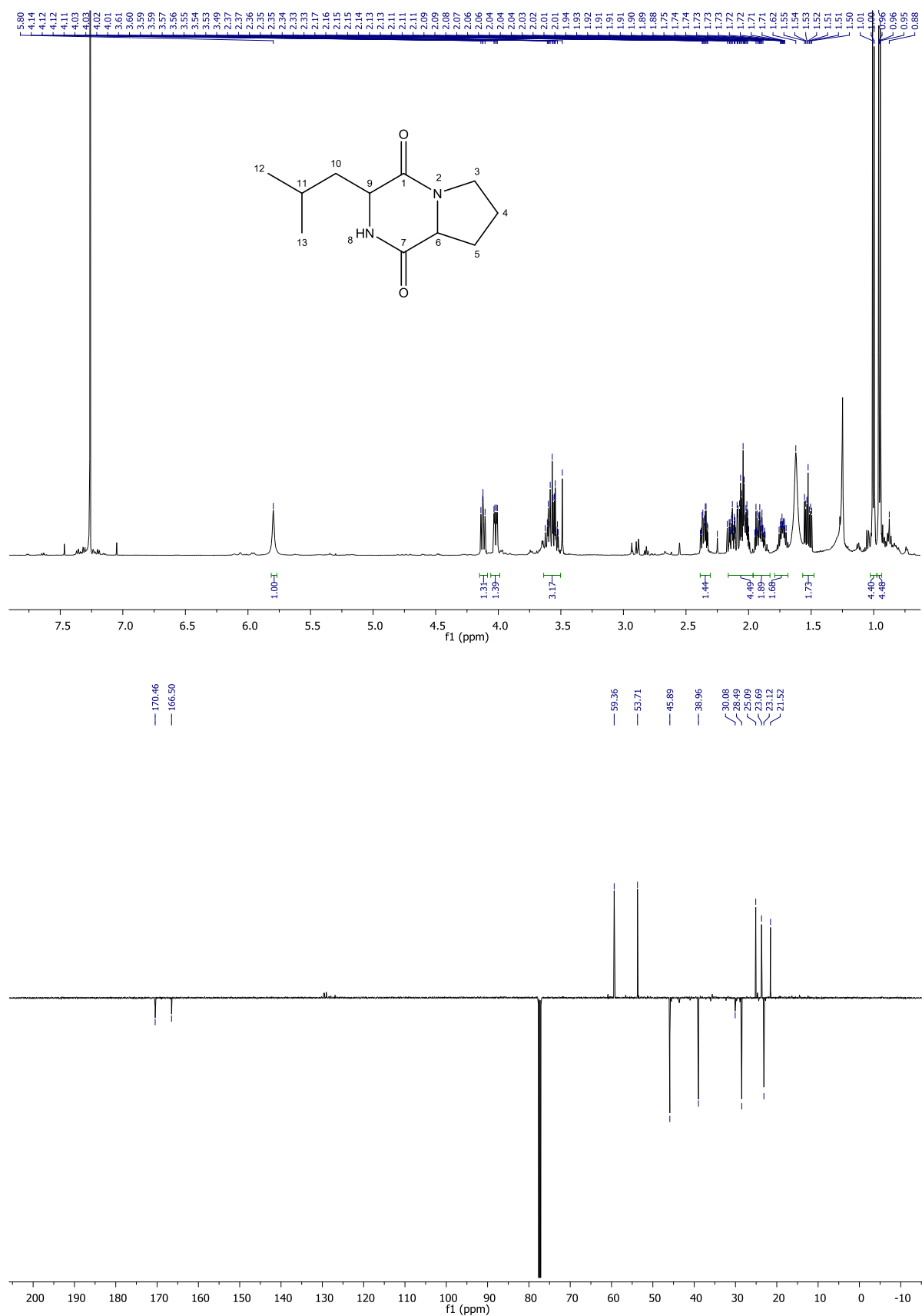
**Annexe 12 : Spectres RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé D2 dans le  $\text{CDCl}_3$**   
(N-acétyl-beta-oxotryptamine)



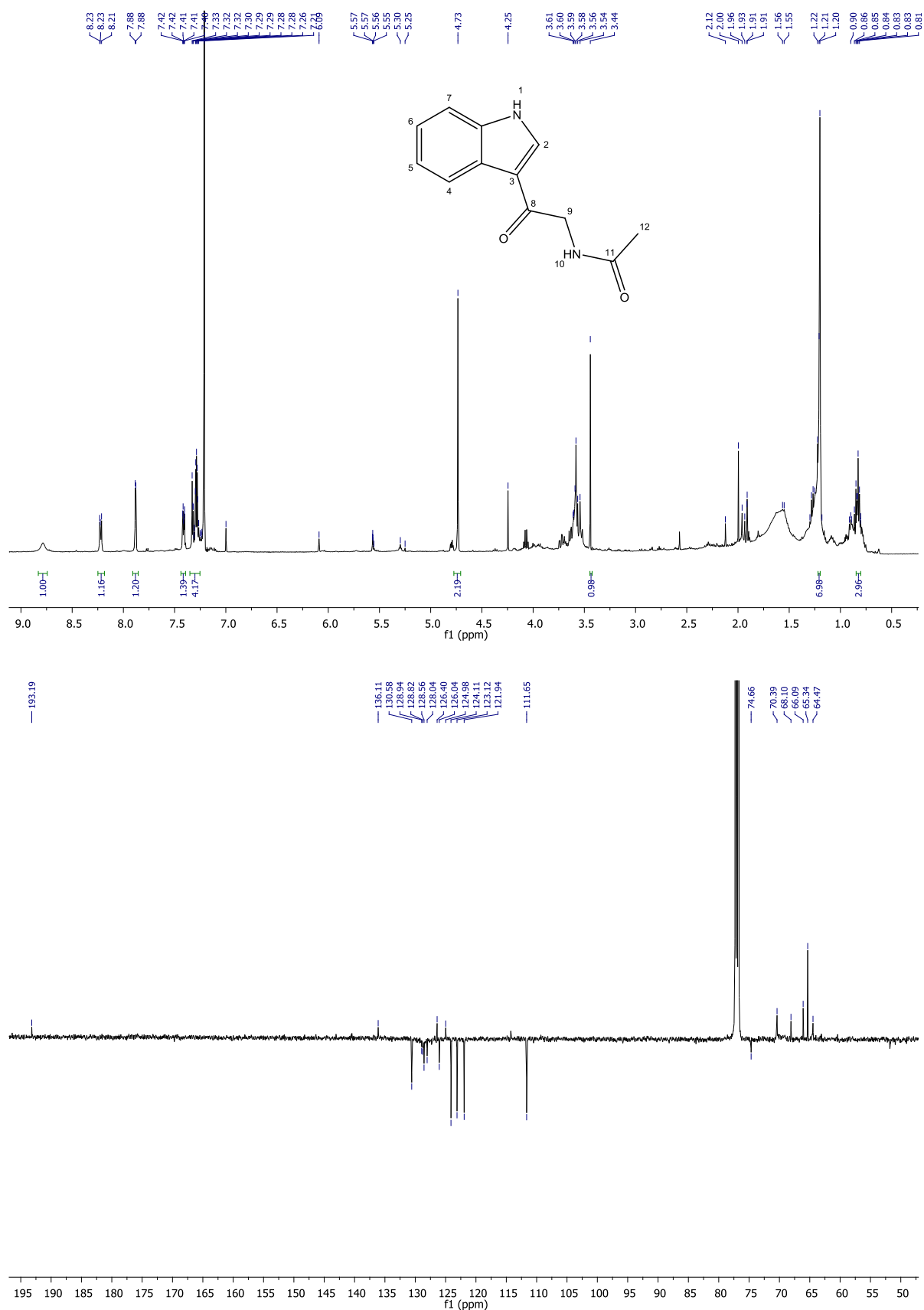
**Annexe 13 : Spectres RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et jmod du composé D7 dans le  $\text{CDCl}_3$   
(Cyclo-(L-leu-L-Phe))**



**Annexe 14 : Spectres RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et jmod du composé D8 et R2 dans le  $\text{CDCl}_3$   
(Cyclo-(L-leu, L-Pro))**

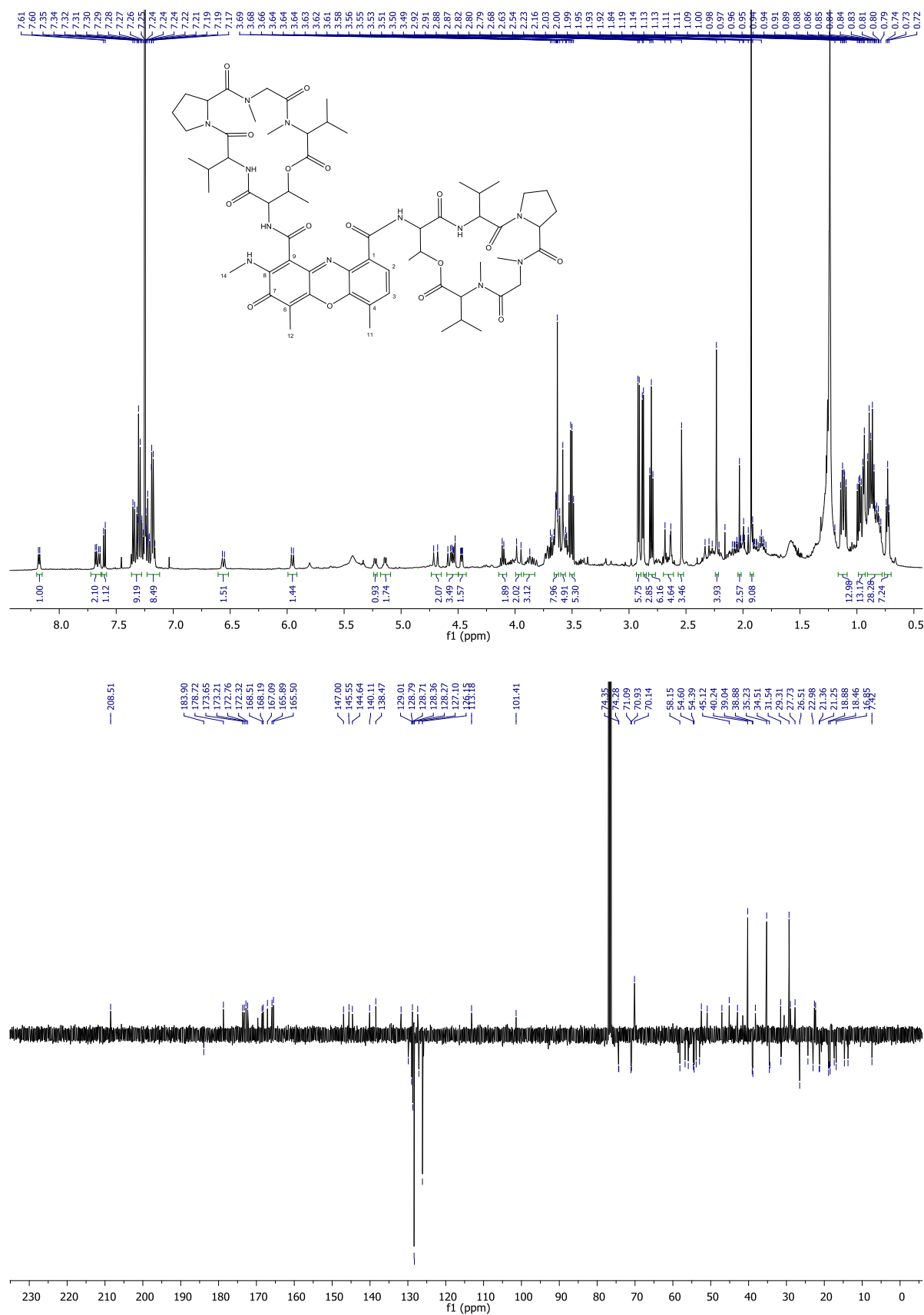


**Annexe 15 : Spectres RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et jmod du composé D10 dans le  $\text{CDCl}_3$**   
**(3-hydroxyacétyl)-indole**

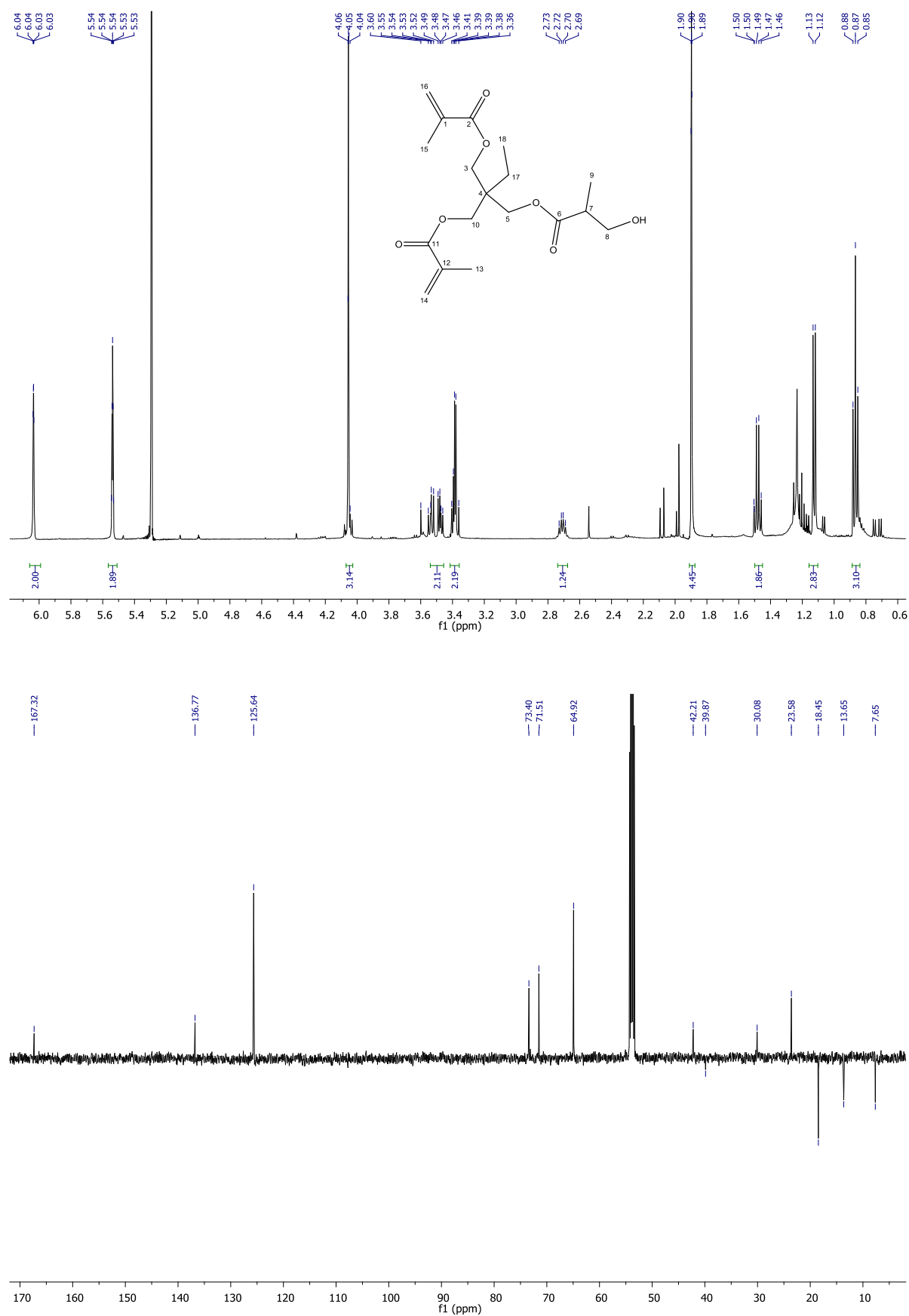




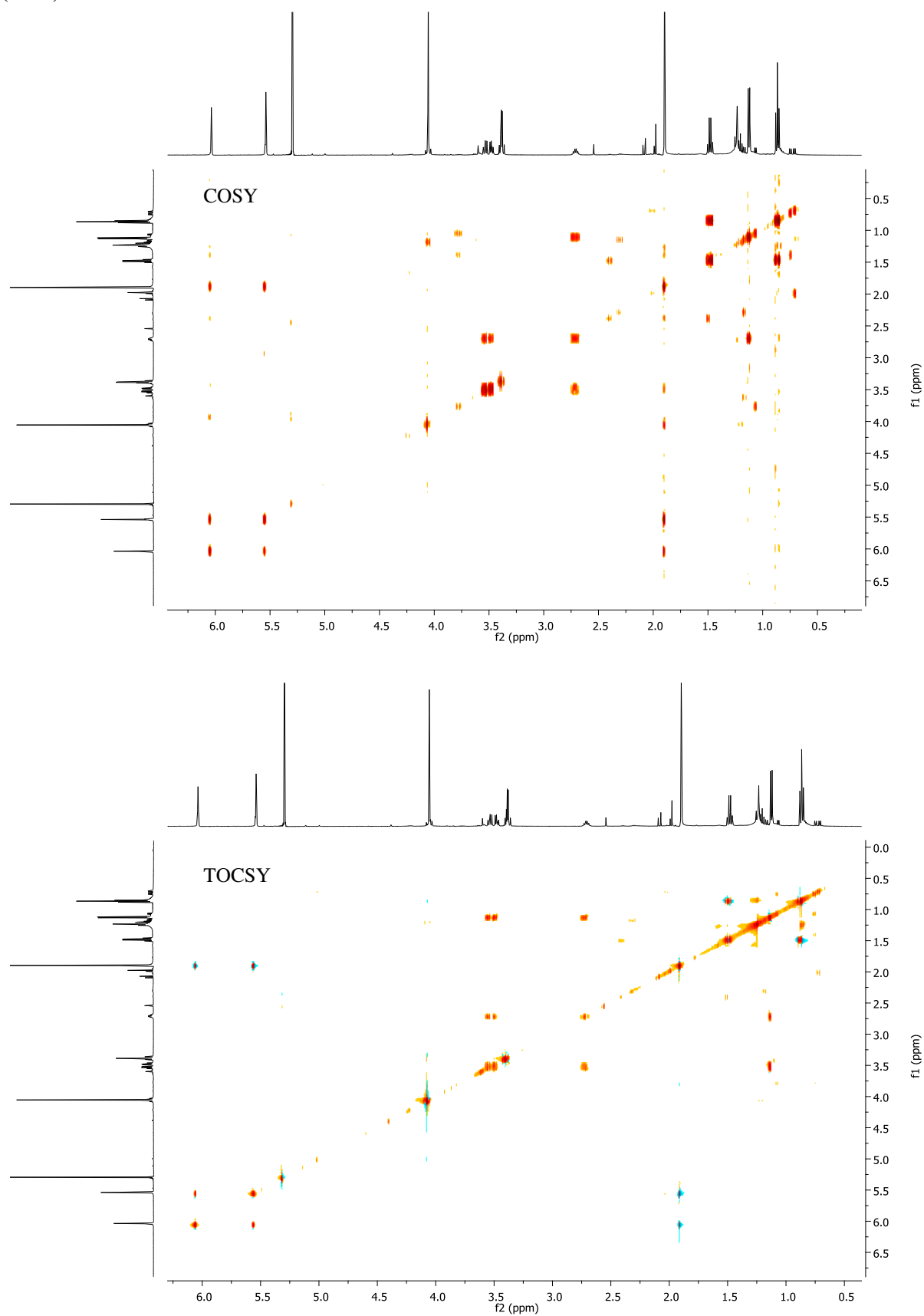
**Annexe 16 : Spectres RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et jmod du composé D9 dans le  $\text{CDCl}_3$**   
**N-Me-Dactinomycine**



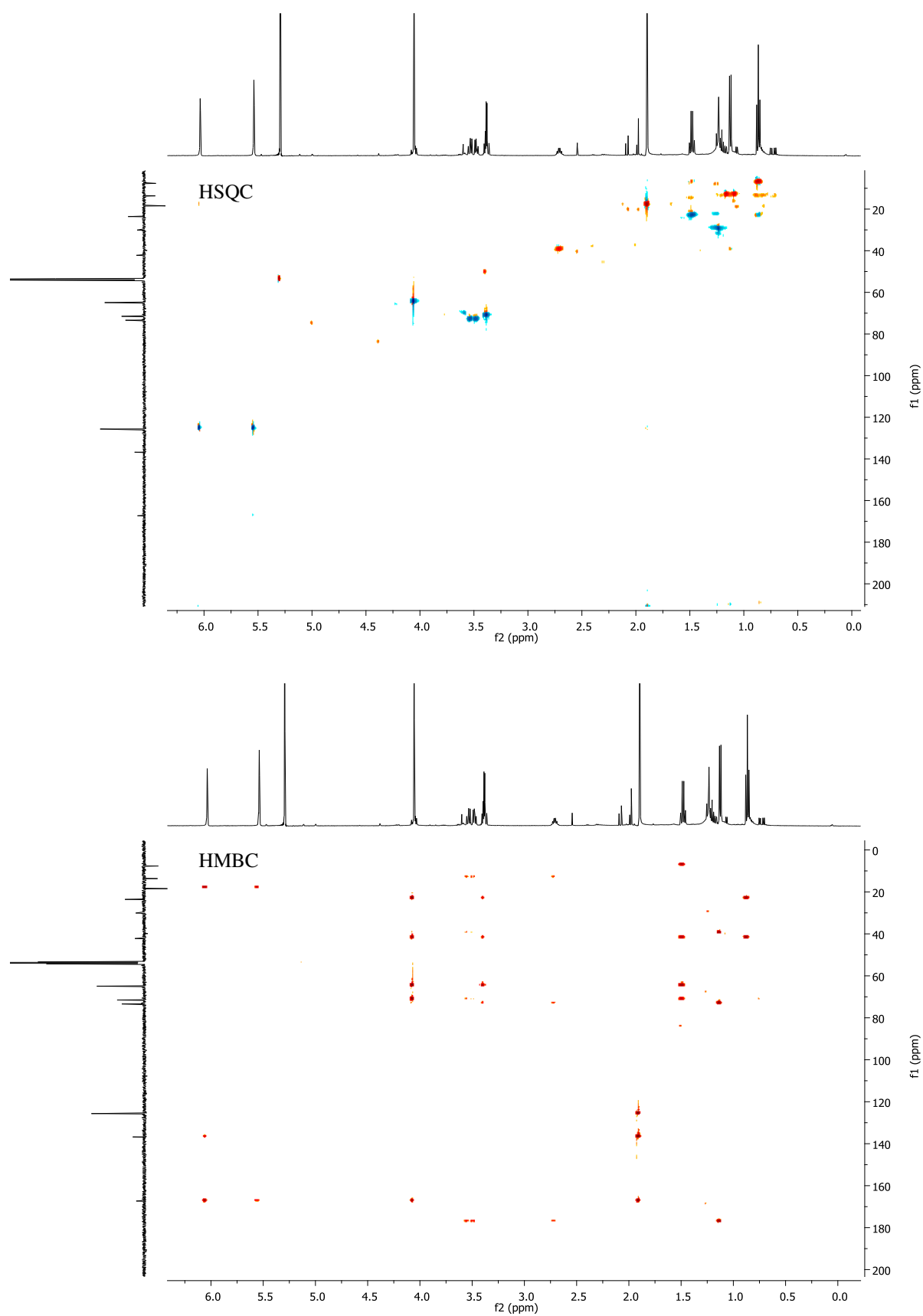
**Annexe 17 : Spectres RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz), jmod, COSY, TOCSY, HSQC et HMBC- du composé D12 dans le  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$**



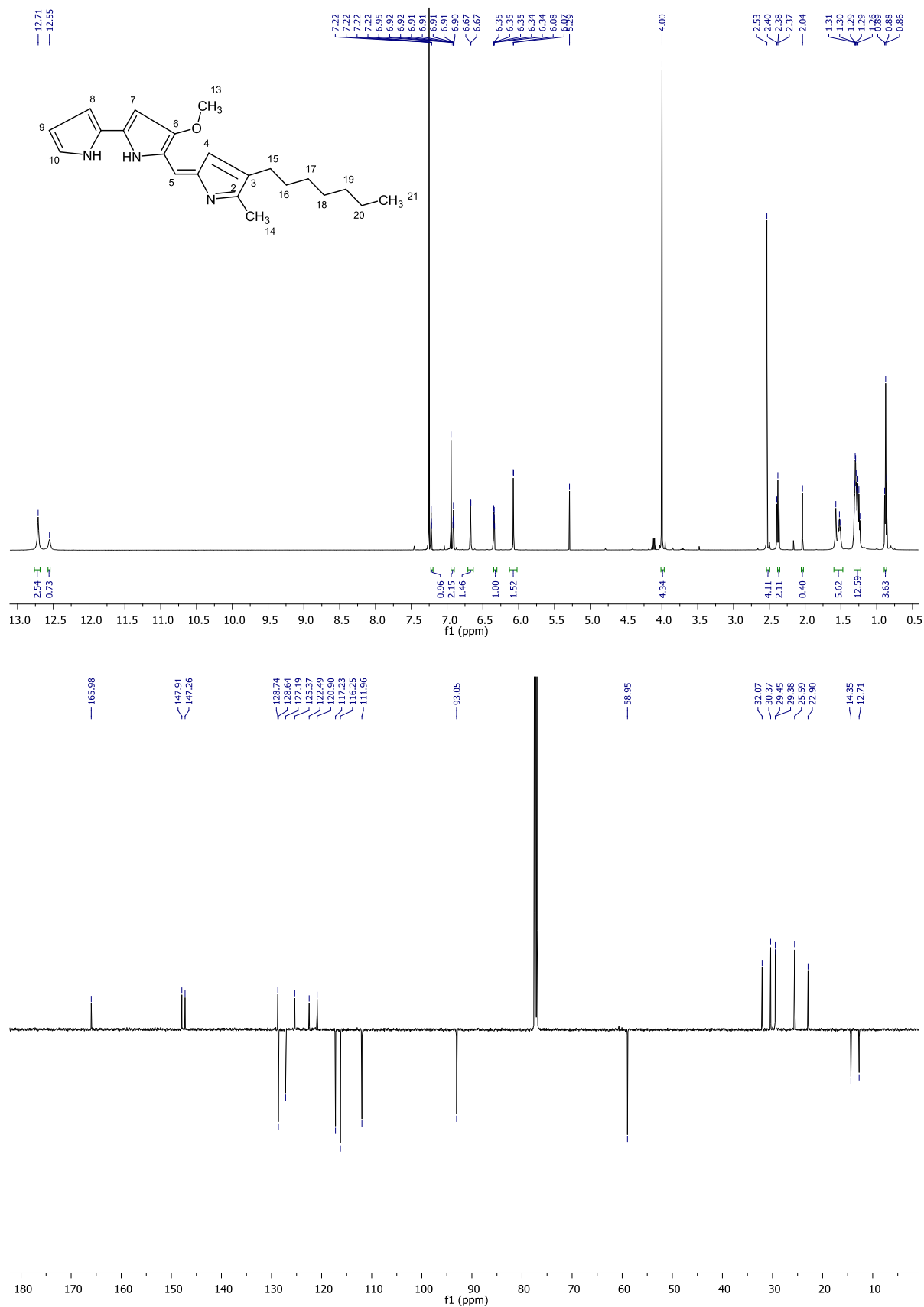
(Suite)



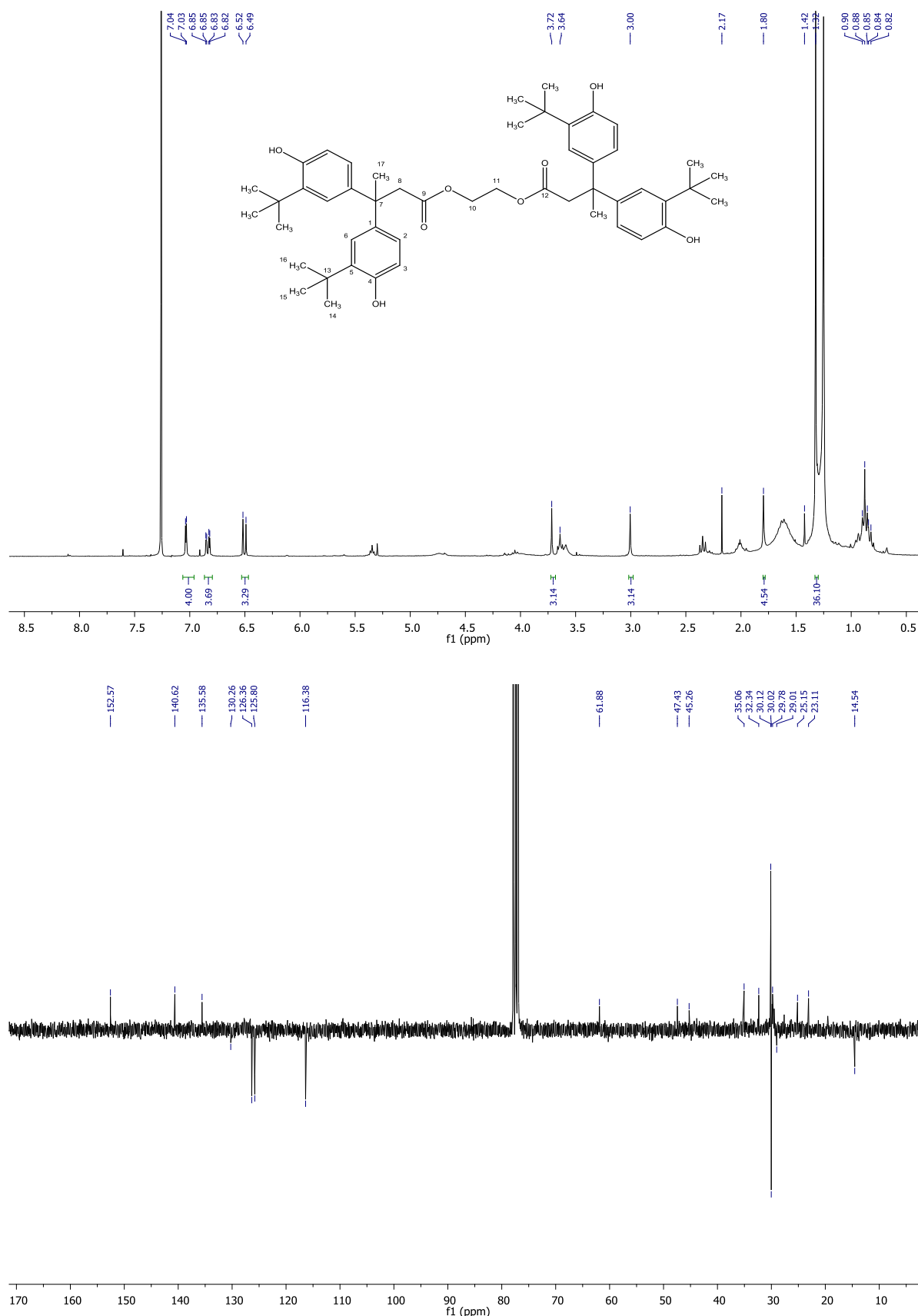
(Suite)



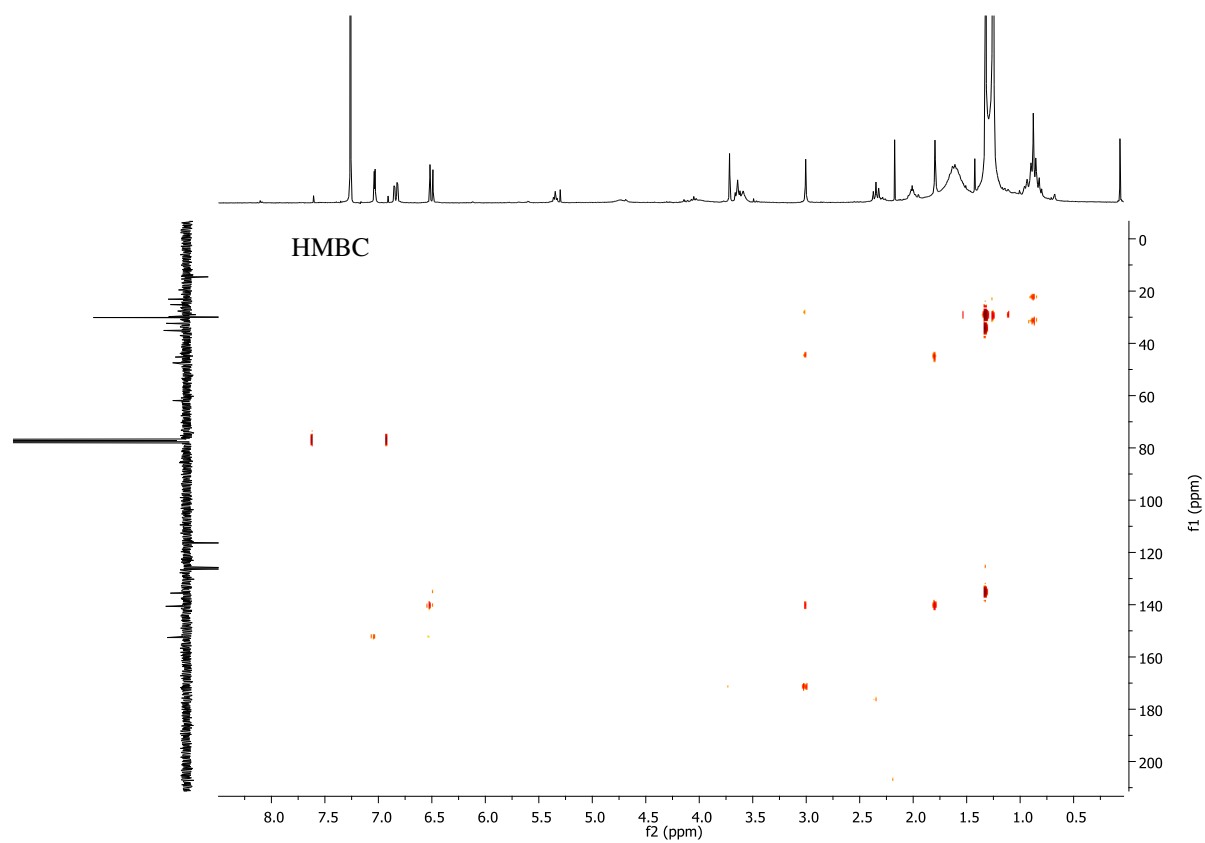
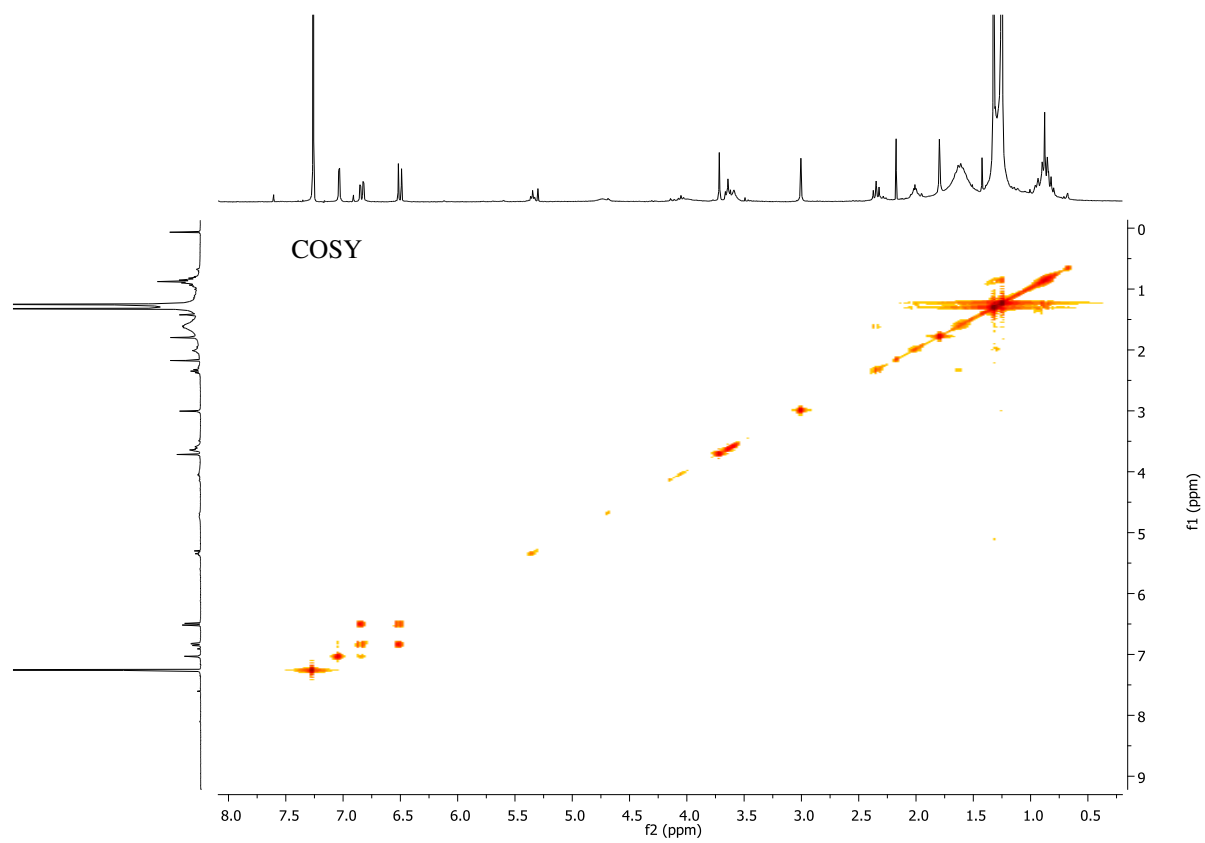
**Annexe 18 : Spectres RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et jmod du composé R1 dans le  $\text{CDCl}_3$**   
(6 méthoxy, 2 méthyl, 3heptylprodiginine)



**Annexe 19 : Spectres RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) jmod, COSY, HMBC du composé R11 dans le  $\text{CDCl}_3$**   
 (Benzenepropanoic acid, 4-(1,1-dimethylethyl)- $\beta$ -[4-(1,1-dimethylethyl)-3-hydroxyphenyl]-3-hydroxy- $\beta$ -methyl-1,2-ethanediyl ester)



(Suite)



## AVIS DU JURY SUR LA REPRODUCTION DE LA THESE SOUTENUE

**Titre de la thèse:**

Étude de quatre lichens marins, maritime ou terrestre et des bactéries associées : Évaluation de la diversité bactérienne et recherche de métabolites d'intérêt

**Nom Prénom de l'auteur : PARROT DELPHINE**

**Membres du jury :**

- Monsieur GRUBE Martin
- Madame TOMASI Sophie
- Monsieur RICHOMME Pascal
- Monsieur STIEN Didier
- Monsieur POTIN Philippe
- Madame CARLETTI Isabelle
- Monsieur SUZUKI Marcelino T.

**Président du jury :**

**Date de la soutenance : 09 Septembre 2014**

**Reproduction de la these soutenue**

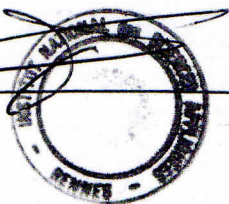
Thèse pouvant être reproduite en l'état

~~Thèse pouvant être reproduite après corrections suggérées~~

Fait à Rennes, le 09 Septembre 2014

Le Directeur,

M'hamed DRISSI



Signature du président de jury

A large, stylized handwritten signature in black ink, likely belonging to the president of the jury.







## Résumé

L'efficacité des antibiotiques actuellement utilisés dans le monde entier est en baisse à un rythme inquiétant. La majorité des produits actifs naturels sont isolés des *ascomycètes* ou des *Actinobactéries*. Parmi les 10 000 antibiotiques connus, plus de la moitié sont produits par des bactéries du genre *Streptomyces*. Il est donc intéressant de rechercher de nouvelles molécules actives dans des niches encore sous explorées, tels que les symbioses microbiennes mutualistes. Ainsi, les lichens sont des organismes complexes abritant des communautés bactériennes à la surface et, plus rarement, à l'intérieur de leurs thalles et constituent un modèle d'étude pour la découverte de nouvelles molécules d'intérêts.

Une optimisation des conditions d'extraction des lichens a été développée. Le profilage chimique par LC / MS de neuf lichens (2 à algues vertes : *Roccella fuciformis* et *R. phycopsis* et de 7 cyanolichens : *Lichina confinis*, *L. pygmaea*, *Leptogium lichenoides*, *Synalissa symphorea*, *Collema auriforme*, *C. cristatum* et *C. fuscovirens*) ont été effectués et comparés avec des approches de «molecular network». Cela a permis de souligner la similitude chimique entre tous les cyanolichens d'une part et les espèces lichéniques à algues vertes d'autre part. Une étude chimique plus approfondie de *R. fuciformis* et *R. phycopsis* a été par la suite effectuée et dix composés différents ont été isolés et identifiés. Neuf d'entre eux ont été isolés et identifiés par RMN et des voies de fragmentation ont été proposées pour cinq d'entre eux. Une étude de localisation *in situ* de leurs métabolites majeurs respectifs (érythrine et acide roccellic pour *R. phycopsis* et érythrine, acide léprarique et acetylportentol pour *R. fuciformis*) a été réalisée et a démontré leur emplacement spécifique au sein des thalles lichéniques.

Les communautés bactériennes cultivables associées à trois lichens de la côte bretonne (France) (*Roccella fuciformis*, *Lichina confinis*, *L. pygmaea*) et un lichen terrestre récolté en Autriche (*Collema auriforme*) ont été étudiées afin de trouver de nouveaux métabolites d'intérêts. L'abondance et la diversité des communautés bactériennes associées à ces lichens a été montrée : 247 souches ont été isolées et identifiées par l'étude du gène de l'ARNr 16S. Ainsi, plus de 30% de toutes les souches expriment des gènes permettant la production potentielle des composés bioactifs et 12% appartiennent probablement à de nouvelles espèces bactériennes. Les métabolites secondaires de deux bactéries cultivables associées ont été étudiés (MOLA1488, *Streptomyces* sp. et MOLA1416, *Hoeflea* sp.) et certains métabolites spécialisés actifs ont été isolés (des dicétopipérazines, des alcaloïdes, des dérivés phénoxazine par exemple ...) présentant des propriétés biologiques intéressantes.

Enfin, pour mettre en évidence les interactions possibles entre les lichens et leurs bactéries associées, une approche de culture (extraits lichéniques et bactéries associées) a été réalisée à partir de 4 souches bactériennes les plus abondantes associées à *Roccella fuciformis* pour (1) évaluer l'impact de ces métabolites sur la croissance de ces quatre souches et également, (2) à évaluer la capacité de bio-conversion de l'acide léprarique et de l'érythrine. Ces bactéries ont montré la capacité de bio-converser l'érythrine en acide orsellinique, mais aucun des quatre métabolites testés n'a affecté leur croissance.

## Abstract

Efficiency of currently used antibiotics is worldwide decreasing at a worrying rate, while we are faced with new and emerging pathogens. The majority of active natural products are isolated from the *Ascomycetes* or from the *Actinobacteria*. Among the 10000 known antibiotics, more than half are produced by bacteria of one single genus, *Streptomyces*. It is therefore most interesting to search for novel active molecules in yet under explored niches, such as mutualistic microbial symbioses. Lichens are complex organisms harboring bacterial communities on the surface and, more rarely, inside their thalli and present a model to discover new biomolecules.

Optimization of extraction conditions of lichens has been developed. Chemical profiling by LC / MS of nine lichens (2 green algae *Roccella fuciformis* and *R. phycopsis* and 7 cyanolichens: *Lichina confinis*, *L. pygmaea*, *Leptogium lichenoides*, *Synalissa symphorea*, *Collema auriforme*, *C. cristatum* and *C. fuscovirens*) were made and compared with a "Molecular network" approach. This has allowed to identify the chemical similarity between all cyanolichens and between two lichen species containing green algae. On the other hand, further chemical study on *R. fuciformis* and *R. phycopsis* was conducted and ten different compounds were isolated. Nine of them have been isolated and identified by NMR and mass fragmentation pathways have been highlighted for five of them. *In situ* localization of their major respective metabolites (erythrin and roccellic acid for *R. phycopsis* and erythrin, leprarinic acid and acetylportentol for *R. fuciformis*) was performed and showed a specific location in the lichen thallus.

We focused also on the cultivable bacterial communities associated to three lichens from Brittany coast (France) (*Roccella fuciformis*, *Lichina confinis*, *L. pygmaea*) and one inland lichen from Austria (*Collema auriforme*) to find new secondary metabolites of interest. The abundance and the diversity of the bacterial communities associated to these lichens were showed: 247 strains were isolated and identified by 16S rRNA gene analysis. More than 30% of all strains express potential bioactive compounds and 12% represent probably new species. The secondary metabolites patterns of their cultivable associated bacteria were studied (MOLA1488, *Streptomyces* sp. and MOLA1416, *Hoeflea* sp.) and some active secondary metabolites were isolated (e.g. dicetopiperazines, pyrrole alkaloids, phenoxazine derivatives ...) showing biological properties.

Finally, to highlight potential interactions between lichens and their associated bacteria, an approach of culture (lichen extracts and bacteria) was performed from 4 most abundant bacterial strains associated with *Roccella fuciformis* to (1) assess the impact of major metabolites (compounds 4) of this lichen on the growth of these four strains by a an optimized method of viability using MTT; and also to evaluate (2) the ability to bioconversion of these four strains of leprarinic acid and erythrin. These bacteria have shown the ability to metabolize erythrin in orsellinic acid, but none of the four tested metabolites has affected their growth.

**Mots clés :** Lichens - Communautés bactériennes cultivables associées - Métabolites spécialisés - Propriétés biologiques  
**Key words:** Lichens - Cultivable lichen-associated bacterial communities - Secondary metabolites - Biological properties